

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica**



**TESIS DOCTORAL**

**Adelinato ciclasas débilmente asociadas a membrana :  
purificación, caracterización y obtención de anticuerpos  
monoclonales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Juan Antonio Reig Macía**

**Madrid, 2015**

TP  
1984  
204

Juan Antonio Reig Macía



\* 5 3 0 9 8 6 7 1 2 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-044254-9

ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA. PURIFICACION,  
CARACTERIZACION Y OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. Nº 204/84**

**© Juan Antonio Reig Macía**  
**Edita e imprime la Editorial de la Universidad**  
**Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía**  
**Noviciado, 3 Madrid-8**  
**Madrid, 1984**  
**Xerox 9200 XB 480**  
**Depósito Legal: M-20406-1984**

JUAN ANTONIO REIG MACIA

ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA.

PURIFICACION, CARACTERIZACION Y OBTENCION

DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Director: Jaime Monreal Llop.

Investigador Científico del C.S.I.C. (Instituto Cajal)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica

Diciembre 1982.





**A Pepa y Julia**



		INDICE
--	--	--------

## CAPITULO I. INTRODUCCION

I.	Acción hormonal	1
II.	La adenilato ciclasa	5
	II,1 Distribución	6
	II,2 Localización celular	6
	II,3 Tamaño	8
III.	Efecto del ión fluoruro	9
IV.	Regulación por hormonas	10
V.	Inhibición de la adenilato ciclasa	12
VI.	Regulación por GTP	16
VII.	Activación por toxina del cólera	20
VIII.	Componentes proteicos del sistema adenilato ciclasa sensible a hormonas	21
	VIII,1 Análisis genético	25
	VIII,2 El receptor	28
	VIII,3 El componente regulador	29
	VIII,4 El componente catalítico	31
IX.	Papel desempeñado por los cationes divalentes - en la actividad de la adenilato ciclasa	32
	IX,1 Efecto del $\text{Ca}^{+2}$	33
	IX,2 Calmodulina y actividad adenilato ciclasa	35
X.	Estructura del sistema adenilato ciclasa sensible a hormonas	40

		INDICE
--	--	--------

XI.	Acoplamiento entre el receptor y la adenilato ciclase	42
XII.	Mecanismo molecular de la modulación hormonal de la adenilato ciclase	45
XIII.	Papel del cAMP en los seres vivos	54
	XIII,1 Quinasas de proteínas dependientes de cAMP	55
	XIII,2 Fosfatasa de fosfoproteínas	60
	XIII,3 Procesos de fosforilación-defosforilación mediados por cAMP	63
	XIII,4 $Ca^{+2}$ y cAMP	67
XIV.	cAMP y adenilato ciclase en bacterias	70
	XIV,1 cAMP en <u>Escherichia coli</u>	70
	XIV,2 La adenilato ciclase en <u>Escherichia coli</u>	73
	XIV,3 Adenilato ciclase en bacterias	77
XV.	Adenilato ciclase y cAMP en protistas	77
	XV,1 <u>Dictiostelium discoideum</u>	78
	XV,2 <u>Blastocladiella emersonii</u>	79
	XV,3 <u>Phycomyces</u>	81
	XV,4 <u>Mucor</u>	82
	XV,5 <u>Coprinus</u>	83
	XV,6 <u>Saccharomyces</u>	84
	XV,7 Protizocarios	85
XVI.	<u>Neurospora crassa</u>	87
	XVI,1 Metabolismo del glucógeno en <u>Neurospora crassa</u>	89
	XVI,2 Adenilato ciclase	91
	XVI,3 Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y quinasas de proteínas	92
	XVI,4 Papel del cAMP en la diferenciación de <u>Neurospora crassa</u>	93

		INDICE
--	--	--------

XVII.	cAMP y adenilato ciclasa en hongos. Generalidades	96
XVII,1	Funciones propuestas para el cAMP	96
XVII,2	Objetivos de la investigación	97

## CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS

I.	Organismo y condiciones de cultivo	102
II.	Homogeneización y fraccionamiento	102
III.	Obtención y permeabilización de conidias	103
IV.	Preparación del sustrato radiactivo de la adenilato ciclasa [ <sup>32</sup> P]ATP	104
V.	Ensayo de la actividad de adenilato ciclasa	107
VI.	Preparación de hexilamino-agarosa	110
VII.	Purificación de la adenilato ciclasa de <u>Neurospora crassa</u>	111
VII,1	Cromatografía en hexilamino-sepharosa	111
VII,2	Filtración en gel de agarosa	112
VII,3	Cromatografía en azul-sepharosa	112
VII,4	Electroforesis preparativa en gel de poliamida	113
VIII.	Caracterización molecular de la adenilato ciclasa	115
VIII,1	Electroenfoque en gradiente de sacarosa	115
VIII,2	Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa	117
VIII,3	Filtración en geles de agarosa	117

		INDICE
--	--	--------

VIII,4	Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Bio-Gel	118
IX.	Cálculo de los parámetros hidrodinámicos y moleculares	118
IX,1	Volumen específico parcial	119
IX,2	Radio de Stokes	120
IX,3	Peso molecular	120
IX,4	Razón friccional	121
IX,5	Parámetros de las proteínas marcadoras	121
X.	Electroforesis analítica en geles de SDS-poliacrilamida	121
X,1	Localización de proteínas	124
X,2	Localización de actividad de adenilato ciclasa	125
XI.	Preparación de adenilato ciclasa soluble de testículo de rata	126
XII.	Preparación de membranas de eritrocito de pavo	127
XII,1	Tratamiento con toxina del cólera	127
XII,2	Tratamiento con detergentes	128
XII,3	Cromatografía en ultrogel	128
XIII.	Procedimiento para la reconstitución de la adenilato ciclasa empleando componentes de distintos - sistemas biológicos	129
XIV.	Medida de la actividad de fosfodiesterasa	130
XV.	Preparación de fosfodiesterasa de cerebro de vaca	131
XVI.	Ensayo de calmodulina	132
XVII.	Purificación de calmodulina de <u>Neurospora crassa</u>	132

		INDICE
--	--	--------

	XVII,1 Cromatografía en DEAE-celulosa	133
	XVII,2 Cromatografía en hidroxilapatito	133
	XVII,3 Cromatografía de afinidad	134
	XVII,4 Filtración en gel	134
XVIII.	Purificación de calmodulina de cerebro de vaca	136
XIX.	Obtención de anticuerpos monoclonales para la - adenilato ciclasa de <u>N. crassa</u>	136
	XIX,1 Procedimiento de inmunización	136
	XIX,2 Procedimiento de fusión y cultivo	137
	XIX,3 Determinación de anticuerpos en el medio condicionado por hibridomas	139
	XIX,4 Determinación de anticuerpos específicos para la adenilato ciclasa	141
XX.	Procedimientos analíticos	142
	XX,1 Determinación de proteínas	142
	XX,2 Determinación de fosfato libre	142
	XX,3 Determinaciones varias	142
XXI.	Productos	143
XXII.	Instrumentación	144

### CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION

I.	Solubilización de la adenilato ciclasa de <u>N. - crassa</u>	147
II.	Purificación de la adenilato ciclasa de <u>N. crassa</u>	154
	II,1 Cromatografía en hexilamino-sepharosa	154
	II,2 Filtración en Bio-Gel A 5 m	154
	II,3 Cromatografía en azul-sepharosa	157



		INDICE
--	--	--------

II,4	Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida	160
II,5	Discusion	160
III.	Caracterización molecular de la adenilato ciclase de <u>N. crassa</u>	170
III,1	Electroenfoque en gradiente de sacarosa	171
III,2	Filtración en gel (Bio-Gel A 5 m)	171
III,3	Ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa	171
III,4	Discusion	176
IV.	Cinética de la adenilato ciclase de <u>N. crassa</u>	178
IV,1	Cinética de la forma soluble de la adenilato ciclase de <u>N. crassa</u>	178
IV,2	Estudio cinético de la adenilato ciclase en conidias permeabilizadas	183
IV,3	Discusión	183
V.	Experimentos de reconstitución del sistema adenilato ciclase sensible a hormona con la enzima de <u>N. crassa</u> y el componente regulador de eritrocito de pavo	187
V,1	Requerimientos para la obtención de sistema reconstituido	189
V,2	Variación de la actividad de adenilato ciclase en el sistema reconstituido en presencia de diversos efectores	193
V,3	Influencia de la concentración de extracto de eritrocito, isoproterenol y fluoruro sobre la actividad de adenilato ciclase en el sistema reconstituido	197
V,4	Reconstitucion de actividad de adenilato ciclase dependiente de $Mg^{+2}$ en membranas de <u>N. crassa</u> usando un extracto de membranas de eritrocito pre-	

		INDICE
--	--	--------

	tratadas con toxina del cólera y $[^{14}\text{C}]$ NAD	197
	V,5 Discusion	201
VI.	Presencia de calmodulina en <u>N. crassa</u>	208
	VI,1 Purificación de la calmodulina de <u>N.crassa</u>	209
	VI,1,1. Cromatografía en DEAE-celulosa	209
	VI,1,2. Cromatografía en hidroxilapatito	212
	VI,1,3. Cromatografía de afinidad en CAPP-sepharosa	212
	VI,1,4. Filtración en gel (Bio-Gel P 60)	215
	VI,2 Discusión	219
VII.	Activación de la adenilato ciclasa de <u>Neurospora</u> por calmodulina	221
	VII,1 Discusión	224
VIII.	Anticuerpos monoclonales para la adenilato ciclasa de <u>Neurospora crassa</u>	228
	VIII,1 Discusión	235
	<u>CAPITULO IV. CONCLUSIONES</u>	239
	<u>CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA</u>	243
	ABREVIATURAS	269
	AGRADECIMIENTOS	270



CAPITULO I		INTRODUCCION
------------	--	--------------

INTRODUCCION

ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA



CAPITULO I	PAGINA	1	INTRODUCCION
------------	--------	---	--------------

## I. ACCION HORMONAL

Probablemente, en los orígenes de la vida, la primitiva membrana que aisló una sencilla maquinaria biológica del entorno acuoso en el que se encontraba, tuvo tan sólo una función estática, actuando como barrera pasiva de permeabilidad (1). La evolución biológica hizo que esta membrana se consolidara como una estructura activa dentro del funcionamiento de los seres vivos (2).

Una de las principales funciones de la membrana plasmática es la de reconocer señales del medio externo y traducirlos en forma de mensajes intracelulares los cuales, a su vez, originan respuestas fisiológicas determinadas. Una de las formas de transmisión de información de unas células a otras, es mediada por las hormonas, que hacen las veces de señal extracelular.

Muchos libros de Fisiología (3) hacen referencia a las hormonas - como "mensajeros químicos", término que lleva implícito el papel de estas sustancias como moléculas portadoras de información (4). Esta información pasa al interior de la célula y allí origina una respuesta enzimática concreta.

En la acción hormonal se puede distinguir entre: la hormona o señal extracelular; el mensaje intracelular, derivado del hecho de que la propia hormona no pueda atravesar la membrana (algunas, como las hormonas esteroidicas sí pueden hacerlo y no entran en las presentes consideraciones); y un sistema de amplificación, - que permita explicar el hecho de que las hormonas sean efectivas a bajas concentraciones.

La explicación en términos moleculares de esta transferencia de información de la hormona al interior de la célula, empezó a ser factible cuando en 1957 el grupo de Sutherland descubrió, trabajando con un homogeneizado hepático, que la adrenalina y el glucagon en presencia de ATP y  $Mg^{+2}$ , eran capaces de activar la fosforilasa hepática (5). Este experimento marcó una pauta en su campo, pues fué el primero que asoció un efecto hormonal concreto en un sistema libre de células, y puede considerarse como la

CAPITULO	I	PAGINA	2	INTRODUCCION
----------	---	--------	---	--------------

primera contribución fundamental dentro de la Endocrinología Molecular. Posteriormente se comprobó que en la activación de la fosforilasa existían dos etapas bien marcadas: en la primera, la fracción de membranas producía un factor termoestable en presencia de hormonas, ATP y  $Mg^{+2}$ ; en la segunda etapa, este factor termoestable estimulaba la formación de fosforilasa activa (5). La identificación de este factor termoestable dió origen al descubrimiento del 3'5' Adenosina monofosfato cíclico (6), llamado comúnmente AMP cíclico (Fig. 1), y a la actividad enzimática responsa-

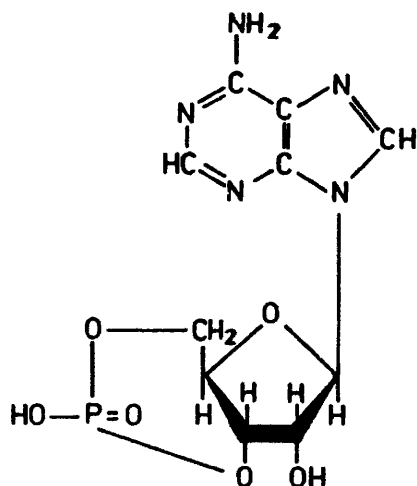


Figura 1. Estructura de la molécula de AMP cíclico.

CAPITULO I	PAGINA 3	INTRODUCCION
------------	----------	--------------

ble de su síntesis se la denominó adenilato ciclasa (7).

Poco después, Butcher y Sutherland, purificaron y caracterizaron la actividad enzimática capaz de inactivar el AMP cíclico (8).

Como resultado de dicha inactivación se producía Adenosina 5' monofosfato (5'AMP). A la enzima responsable de tal reacción se la denominó fosfodiesterasa, y se comprobó que su actividad podía inhibirse en presencia de metilxantinas (Fig. 2).

En el esquema propuesto por Sutherland, al AMP cíclico actuaría como un mensajero intracelular o segundo mensajero, y la hormona representaría la señal externa o primer mensajero (9) (10).

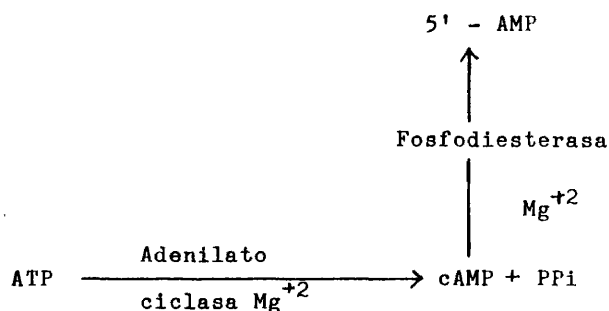


Figura 2. Reacciones catalizadas por la Adenilato ciclasa y la Fosfodiesterasa.

De la unión de la hormona a un receptor específico en la cara externa de la membrana, surgiría una interacción con la adenilato - ciclasa en la cara interna, que se traduciría en una variación en los niveles intracelulares de cAMP. Esta variación en la concentración de cAMP provocaría una respuesta determinada de la célula como, por ejemplo, cambios en la concentración de ciertos metabolitos (El modo de acción del cAMP se verá más adelante). En la figura 3, se esquematiza el modelo de los dos mensajeros:



CAPITULO	I	PAGINA	4	INTRODUCCION
----------	---	--------	---	--------------

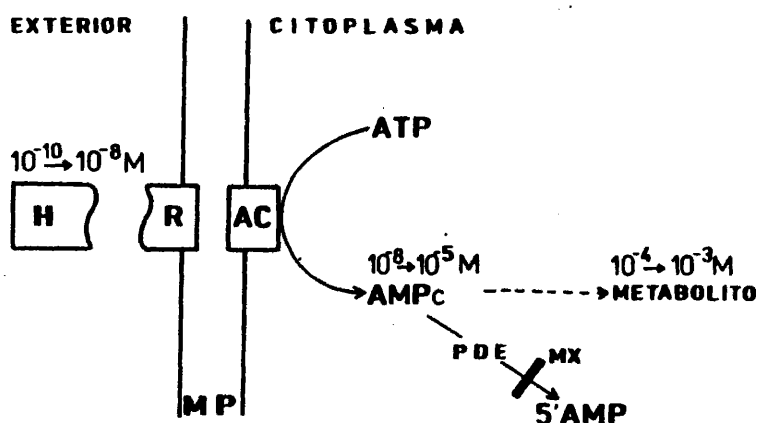


Figura 3. Modelo de los dos mensajeros.  
H= hormona; R= receptor; MP= membrana plasmática; AC= adenilato ciclasa; PDE= fosfodiesterasa de AMP cíclico; MX= metilxantinas.

El sistema de acción hormonal es un sistema de amplificación, dado que un aumento de concentración de hormona entre  $10^{-10}$  y  $10^{-8}$  M, provoca un aumento de concentración de cAMP entre  $10^{-8}$  y  $10^{-5}$  M, éste, a su vez, da lugar a una variación de la concentración de determinados metabolitos, como por ejemplo, en el caso de la glucosa 6 fosfato, ésta puede aumentar su concentración de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M, lo cual implica una amplificación de la señal del orden de diez veces (Fig. 3).

El modelo de los dos mensajeros descrito, ha demostrado ser uni -

CAPITULO	I	PAGINA	5	INTRODUCCION
----------	---	--------	---	--------------

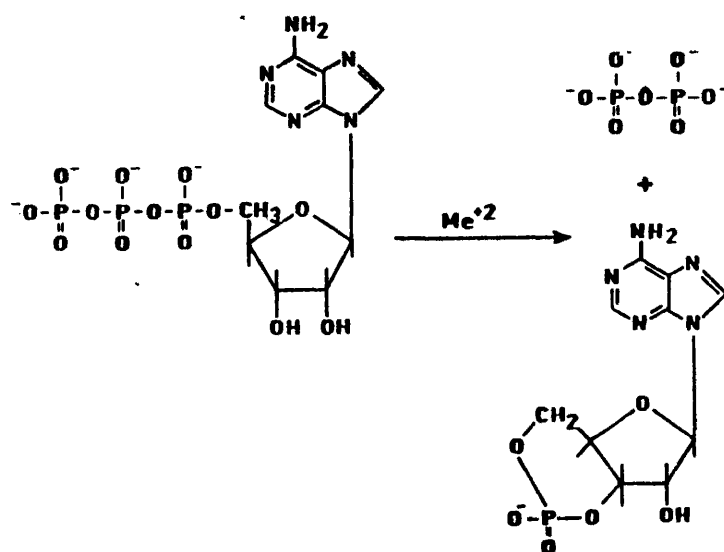
versal para todas las hormonas que actúan a través de la acción - del cAMP.

Dentro de los mensajeros intracelulares con función de amplificación de señales extracelulares, se encuentran, además del cAMP, - aquellos de naturaleza iónica simple, siendo el  $\text{Ca}^{+2}$  el más estudiado, son numerosos los estudios realizados sobre sus implicaciones en la fisiología de la contracción muscular (11).

Probablemente, en un futuro no muy lejano, se descubran nuevas sustancias que actúen como "segundos mensajeros". Uno de los compuestos más intensamente estudiados en la actualidad bajo esa perspectiva es el 3', 5' Guanosina monofosfato cíclico (cGMP)(12).

## II. LA ADENILATO CICLASA

La adenilato ciclasa (ATP pirofosfato liasa ciclante E.C.4.6.1.1) es la enzima responsable de la síntesis del cAMP según la reacción



CAPITULO I	PAGINA 6	INTRODUCCION
------------	----------	--------------

Los sustratos de esta reacción pueden ser los complejos Mg ATP o Mn ATP, actuando los cationes divalentes  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$  como activadores de la misma.

En el caso de algunas adenilato ciclasas como la de Neurospora - (13) y la de testículo (14), la dependencia de  $Mn^{+2}$  es casi absoluta.

Aunque la concentración de  $Mg^{+2}$  es aproximadamente diez veces mayor que la de  $Mn^{+2}$ , la mayor afinidad del ATP por éste último podría explicar que la enzima actuase "in vivo" con ambos cationes (15).

La reacción catalizada por la adenilato ciclasa puede ser reversible bajo algunas circunstancias (16), pero probablemente, la conversión de cAMP a ATP no debe ocurrir de forma significativa en las condiciones que prevalecen en los seres vivos.

## II.1. DISTRIBUCION

La adenilato ciclasa está presente en todo el reino animal (17), tanto en vertebrados como en invertebrados, protozoos (18), hongos (13), levaduras (19) y bacterias (20).

En las plantas superiores no existen evidencias concluyentes sobre la existencia de cAMP ni de las enzimas implicadas en su metabolismo (21).

## II.2. LOCALIZACION CELULAR

Los primeros trabajos de Sutherland (7) demostraron que la actividad adenilato ciclasa estaba fuertemente asociada con la fracción

CAPITULO I	PAGINA 7	INTRODUCCION
------------	----------	--------------

sedimentable de los homogenados tisulares. Davoren y Sutherland (22), demostraron en membranas de eritrocitos que: la enzima sedimentaba con la fracción de 600 x g que no está localizada predominantemente en la fracción mitocondrial y que podía separarse de contaminantes nucleares por centrifugación en soluciones de glicerol al 20 %.

Una demostración concluyente en este sentido la realizaron poco después Rodbell y colaboradores (23) al establecer la existencia de actividad adenilato ciclase en preparaciones muy puras de membranas plasmáticas de hepatocitos, obtenidos según el método de Neville (24).

Existen autores que describen la existencia de actividad adenilato ciclase asociada a microsomas (25), núcleos (26) o retículo endoplasmático (27), en ninguno de estos casos, sin embargo, se demuestra en forma convincente que las bajas actividades encontradas no puedan deberse a contaminaciones de la membrana plasmática.

En todas las células eucariotas estudiadas la adenilato ciclase se encuentra asociada a membrana, siendo excepción a esta regla la adenilato ciclase de túbulos seminíferos que tiene localización citoplasmática (28) (29).

Para poder caracterizar a la adenilato ciclase se recurrió al uso de detergentes no iónicos que posibilitaran su obtención en forma solubilizada y poder así emplear los métodos usuales de la química de proteínas. Algunos de los detergentes empleados con este propósito han sido: Lubrol PX (30), Tritón X100 (31), Tritón X305 (32) entre otros.

En organismos eucariotes inferiores y bacterias, como más adelante se verá en detalle, la asociación de la enzima a la membrana es, en muchos casos, más débil y paralelamente al uso de detergentes ha sido posible obtener un cierto porcentaje de la actividad enzimática total en forma soluble sin el empleo de los mismos (19) (ver resultados).

CAPITULO I	PAGINA 8	INTRODUCCION
------------	----------	--------------

### II.3. TAMAÑO

A pesar de que ya en 1962 se había conseguido solubilizar la adenilato ciclase con detergentes no iónicos (7), hace pocos años - que comenzaron a realizarse estudios hidrodinámicos sobre el tamaño de la enzima.

En 1974, Neer (31) determinó el coeficiente de sedimentación y el radio de Stokes de la adenilato ciclase de médula renal y se calculó para la enzima un peso molecular de 159.000 D.

Por métodos experimentales semejantes, Neer (33), Haga (34) y Stengel (35) han demostrado que la adenilato ciclase de cerebro, células del linfoma S49 e hígado respectivamente, son proteínas de mayor tamaño, oscilando su peso molecular entre 200 y 300000 D.

Como un método alternativo, Schlegel y colaboradores (36) (37) emplearon la técnica de "inactivación por irradiación" para estimar el tamaño de la adenilato ciclase de hígado de rata en membranas intactas. Esta metodología permite calcular el tamaño aparente - de una proteína determinada "in situ", siguiendo la pérdida de - funcionalidad de la proteína en la membrana con dosis crecientes de radicación. La irradiación se lleva a cabo usando electrones de alta energía, bajo condiciones definidas y el tamaño de la unidad funcional se estima a partir de la representación del logaritmo de la actividad remanente en función de la dosis de radicación. De esta forma, determinaron para la adenilato ciclase, un peso molecular aparente de 230-240000 D. valor que coincide con los obtenidos por estudios hidrodinámicos de la enzima solubilizada (38). Más recientemente, el mismo grupo (39) calculó un peso molecular de 226000 D. para la adenilato ciclase de eritrocito de pavo, empleando la misma metodología.

Las diferencias entre los distintos tamaños calculados para la adenilato ciclase según la fuente de origen, no han sido aún del todo comprendidas, los estudios de "inactivación por irradiación" predicen, no obstante, la existencia de diferentes agregados moleculares de la enzima en la membrana (38) (40).

CAPITULO I	PAGINA 9	INTRODUCCION
------------	----------	--------------

### III. EFECTO DEL ION FLUORURO

Los primeros trabajos de Sutherland sobre el cAMP (41) (42) ya dan cuenta del efecto estimulador "in vitro" del NaF sobre la actividad de la adenilato ciclasa, este efecto se puede generalizar hoy día a todas las adenilato ciclasas descritas de organismos eucariotes, con excepción de aquellas que son dependientes de  $Mn^{+2}$ . El tratamiento "in vivo" de preparados celulares con  $F^-$  no origina ningún cambio aparente sobre los niveles de cAMP (10).

La activación por  $F^-$  requiere de un catión divalente para manifestarse ( $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ ), es poco reversible y dependiente del tiempo y la temperatura (43).

El mecanismo por el cual el  $F^-$  activa la adenilato ciclasa se desconoce en la actualidad, sin embargo, está demostrado que dicha activación no se debe al conocido efecto inhibitorio del  $F^-$  sobre la ATPasa (ATP fosfohidrolasa, E.C. 3.6.1.3.), ya que, entre otras cosas, la  $K_m$  aparente para el ATP no cambia durante la activación por el  $F^-$  (44).

Existen claras diferencias entre el proceso a través del cual el  $F^-$  activa la adenilato ciclasa y la activación hormonal de la misma:

1. Las adenilato ciclasas solubilizadas por detergentes pierden su capacidad de respuesta hormonal y, sin embargo, son sensibles al  $F^-$  (45).
2. La concentración de  $F^-$  que proporciona la mitad de la estimulación máxima varía con la temperatura, mientras que la de las hormonas no (46).
3. Las curvas que representan el efecto del  $F^-$  frente a su concentración son hiperbólicas, sin embargo, las de las hormonas no lo son (47).

Se ha puesto de manifiesto el hecho de que el  $F^-$  es capaz de inhibir la respuesta hormonal de determinadas adenilato ciclasas.

CAPITULO I	PAGINA 10	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

Harwood y Rodbell (48) encontraron que el  $F^-$  inhibe la acción estimuladora de la adrenalina y la ACTH, sugiriendo que dicho anión podría actuar desacoplando el proceso hormonal, posterior a la unión de la hormona al receptor. En este sentido, Manganiello y Vaughan (49-51) demostraron trabajando con la adenilato ciclase de células grasas que el  $F^-$  era también capaz de inhibir el efecto estimulador del isoproterenol y mientras que el pirofosfato  $(1,5 \text{ mM})$ , anulaba el efecto activador del  $F^-$ , no afectaba sin embargo, la inhibición del efecto del isoproterenol, lo cual hace suponer que ambos efectos del  $F^-$  son independientes.

#### IV. REGULACION POR HORMONAS

Existen muchas hormonas que ejercen su acción celular a través de una modificación de la actividad de la adenilato ciclase (10), la mayoría de ellas ejerce un efecto activador, mientras que otras, como la insulina ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima(52).

La hormona se une a una proteína receptora específica, capaz de discriminar entre las hormonas circulantes, situada en la cara externa de la membrana plasmática, de esta forma el receptor ocupado es capaz entonces de interaccionar, directa o indirectamente, con la adenilato ciclase, modulando su actividad. Este proceso permite un flujo vectorial de información al interior de la célula(47).

La función discriminante de los receptores desde la cara externa de la membrana, fué puesta de manifiesto por experiencias de Schimmer (53), y Rodbell (54); éste último, demostró que el tratamiento con tripsina de adipocitos intactos, reducía la capacidad de respuesta del sistema adenilato ciclase a diferentes hormonas, sin afectar la expresión de la actividad basal (55).

Los receptores son extremadamente específicos para las características

CAPITULO I	PAGINA 11	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

ticas estereoquímicas de las hormonas, ésto es bien patente, por ejemplo, en las células grasas, donde existen cinco tipos distintos de receptores, cada uno capaz de activar la adenilato ciclasa (46). Es significativo, en este sentido, el hecho de que la eliminación de la histidina terminal del glucagón, suponga una reducción de la afinidad del receptor de unas 15-20 veces (56).

Sutherland y colaboradores sugirieron originariamente cuatro criterios que deberían cumplirse para asegurar que un determinado efecto hormonal fuera mediado por cAMP:

1. La hormona debe estimular a la adenilato ciclasa en extractos libres de células.
2. Niveles fisiológicos de la hormona deben producir un incremento en los niveles de cAMP que ocurra antes de o concomitante con la respuesta fisiológica.
3. Las metilxantinas (teofilina, cafeína, aminofilina) deben potenciar la acción hormonal, debido al efecto inhibitorio de éstas sobre la fosfodiesterasa (3', 5' cAMP nucleótido hidroxilasa E.C. 3.1.4.17.).
4. El agregado de cAMP exógeno o cualquiera de sus análogos, debe imitar el efecto de la hormona.

Fain y Butcher (57) proponen agregar un quinto criterio:

5. La toxina del cólera debe imitar el efecto de la hormona, después de un periodo de latencia de 1-2 horas (apartado VIII).

Los sistemas de activación de la adenilato ciclasa por diferentes hormonas, poseen las siguientes características:

- a) Las funciones discriminatorias de los receptores acoplados a la adenilato ciclasa y la consiguiente activación hormonal de la enzima, no requieren de la integridad celular. Así pues, los estudios concernientes a las propiedades de los receptores en sistemas libres de células, proporcionan una información válida y aplicable al comportamiento del receptor "in vi



CAPITULO I	PAGINA 12	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

vo" (53) (58).

- b) La activación hormonal es un proceso rápido y reversible, es decir, desaparece al eliminar la hormona o al añadir un antagonista (59) (60).
- c) Cada hormona estimula la adenilato ciclase en un rango de concentración que le es propio.
- d) La estimulación máxima lograda varía según la hormona de que se trate.
- e) Antagonistas específicos bloquean solamente los efectos de los agonistas correspondientes y no los de otras hormonas.
- f) Las hormonas actúan desde el lado externo de la membrana plasmática.

En la tabla I se describen las principales hormonas que modifican la actividad de la adenilato ciclase, el tejido en el que actúan y la respuesta biológica que producen.

#### V. INHIBICION DE LA ADENILATO CICLASA

Existen algunas hormonas y neurotransmisores que actuando vía receptores asociados a membrana, inducen rápidas respuestas celulares que no son mediadas por un incremento en la formación de cAMP.

Esta acción hormonal está representada por los efectos  $\alpha$  adrenérgicos de las catecolaminas, los efectos muscarínicos de la acetilcolina, los efectos de la histamina (vía receptores  $H_1$ ), de la morfina y otros opiáceos, la actividad vasopresora de la hormona antidiurética y los efectos de la angiotensina II (61).

Se han observado con estas hormonas y neurotransmisores diversos cambios celulares que pueden servir como señales intracelulares.

ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA
--

CAPITULO 1	PAGINA 13	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

TABLA I

Hormona, tejido u órgano y respuesta fisiológica que implican al cAMP como segundo mensajero.

<u>HORMONA</u>	<u>TEJIDO U ORGANO</u>	<u>RESPUESTA</u>
Adrenalina	Hígado	Glucogenolisis
	Músculo esquelético	Glucogenolisis
	Miocardio	Efecto inotrópico
	Glándula salival	Secreción de - amilasa
	Tejido adiposo	Lipolisis
Noradrenalina	Sistema Nervioso	Liberación de - acetilcolina
	Glándula pineal	Síntesis de melanotoninas
Corticotrofina (ACTH)	Adrenales	Producción de - Esteroides
Tirotrófina (TSH)	Tejido adiposo	Lipolisis
	Tiroides	Hidrolisis de - Tiroglobulina
		Iodación
Hormona Paratiroidea		Oxidación de - glucosa
	Corteza renal	Fosfaturia
	Huesos	Reabsorción de calcio
Hormona Luteizante (LH)	Cuerpo luteo	Síntesis de Esteroides
Vasopresina	Medula renal	Reabsorción de agua
Prostaglandinas	Hipofisis	
	Tiroides	
	Bazo	
Melanotrofina	Músculo esquelético	
	Piel de anfibios	Melanización

CAPITULO I	PAGINA 14	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

transfiriendo la información desde el receptor asociado en la -  
membrana, hasta un sistema sensible en el interior de la célula.  
Estas señales pueden suponer un incremento en:

el recambio de fosfatidil inositol, la concentración de  $Ca^{+2}$  ci-  
toplasmático, la liberación y peroxidación del ácido araquidóni-  
co, y los niveles de cGMP (62) (63). El aumento en la concentra-  
ción intracelular de  $Ca^{+2}$  es la señal más importante, siendo las  
demás una consecuencia primaria o secundaria de los cambios en -  
la distribución del citado catión (61).

Dentro de las acciones celulares por algunas de estas hormonas -  
se encuentra la de producir una disminución en los niveles intra-  
celulares de cAMP. Esto se ha descrito en una gran variedad de  
tejidos (64) (tabla II).

La disminución en los niveles de cAMP se debe a la acción sobre  
la adenilato ciclasa. Se han descrito sólo, algunos casos para  
la insulina (65), donde la disminución de cAMP se debe a una ac-  
ción sobre la fosfodiesterasa.

La implicación aparente en la mayoría de los casos de la adenila-  
to ciclasa en la reducción de los niveles de cAMP, permite supo-  
ner la existencia de una regulación dual de la actividad enzimá-  
tica por hormonas, mediante receptores separados para los efec-  
tos activadores e inhibidores (66).

La inhibición inducible por hormonas fué inicialmente descrita -  
en un sistema libre de células en 1962, por Murad y colaborado-  
res (67). Posteriormente, y sobre todo en los últimos años, se  
han obtenido múltiples evidencias de este fenómeno en una gran -  
variedad de preparaciones libres de células de diferentes teji-  
dos (68-70).

Algunas características básicas de la inhibición de la adenilato  
ciclase por hormonas y neurotransmisores son similares a las des-  
critas para la estimulación hormonal.

Agonistas de la inhibición hormonal reducen la actividad basal -  
de la adenilato ciclase, así como la actividad estimulada por -

CAPITULO I	PAGINA 15	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

TABLA II

Factores hormonales que producen inhibición de la Adenilato ci -  
clasa y Sistemas celulares donde se ha observado.

<u>FACTOR HORMONAL</u>	<u>SISTEMA CELULAR</u>
Agonistas $\alpha$ -Adrenérgicos	Plaquetas humanas Plaquetas de conejo Adipocitos de Hamster Adipocitos humanos Hígado de rata
Agonistas Colinérgicos (Muscarínidos)	Miocario de perro Miocardio de conejo Parótida de rata Híbridos celulares de Neuroblastoma y glioma
Opiáceos	Híbridos celulares de Neuroblastoma y glioma
Adenosina	Adipocitos de rata Adipocitos de Hamster
ADP	Plaquetas humanas
Prostaglandinas E1, E2	Adipocitos de Hamster Adipocitos de rata Adipocitos humanos
Acido Nicotínico	Adipocitos de Hamster Adipocitos de rata Adipocitos humanos
Dopamina	Adenoma de pituitaria humana
Angiotensina II	Hígado de rata

CAPITULO I	PAGINA 16	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

otras hormonas. Las máximas inhibiciones observadas para la enzima en su estado basal oscilan entre el 40 y el 80 %.

Al igual que se observa para la estimulación de la adenilato ciclase, las máximas inhibiciones descritas para determinados agonistas, son variables y sus efectos no son aditivos (71).

La inhibición de la adenilato ciclase en homogenados celulares y membranas purificadas, se produce en forma rápida, sin una aparente fase de latencia y es inmediatamente revertida por antagonistas. Estos datos prueban que la inhibición por hormonas y neurotransmisores es un efecto mediado por receptores específicos y que se produce, no por cambios en el citoplasma debidos a la acción hormonal sino a nivel de la membrana plasmática (61).

Han merecido especial interés los efectos de la adenosina sobre la actividad de la adenilato ciclase. Estudios recientes han demostrado la existencia de dos sitios de interacción para el citado nucleósido, fácilmente distinguibles por criterios químicos y funcionales. Uno denominado "sitio P" (72) estaría localizado en la cara citoplasmática de la membrana, probablemente en el componente catalítico de la enzima. A través de este sitio de interacción la adenosina ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de la adenilato ciclase.

El otro punto de interacción, denominado "sitio R" estaría localizado en la cara externa de la membrana y posee todas las propiedades asociadas con las respuestas de la enzima, mediadas por receptores hormonales. Este sitio R puede ser subdividido en dos, uno a través del cual se producen los efectos estimuladores sobre la actividad de la adenilato ciclase, y otro, a través del cual se producen los efectos inhibidores (73).

## VI. REGULACION POR GTP

CAPITULO I	PAGINA 17	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

Tanto el GTP como los demás nucleótidos de guanina, ejercen por ellos mismos diversos efectos estimuladores e inhibidores de la actividad de la adenilato ciclasa. Dichos efectos varían con el tipo de célula, el pH, la concentración de catión divalente, la fuerza iónica, etc (74) (75).

La primera observación clave sobre la posible función biológica del GTP, fué que este nucleótido es un requerimiento absoluto para la estimulación hormonal de la adenilato ciclasa (76). Esto fué posteriormente corroborado en membranas de diferentes tipos celulares (77).

Igualmente se pudo demostrar que el GTP era también un factor esencial para la inhibición de la enzima por determinadas hormonas y neurotransmisores (61).

Otro hecho significativo demostrado por el grupo de Rodbell fué que, permitiendo el GTP la activación hormonal de la enzima, también frecuentemente disminuía la afinidad del receptor por la hormona (78). Este efecto fué poco después estudiado en mayor detalle para los receptores del glucagón (79), prostaglandina  $E_1$  (80) (81) y agonistas  $\beta$  adrenérgicos (82).

En el caso concreto del glucagón, Rodbell y colaboradores (83), demostraron que membranas plasmáticas de hígado "pre-marcadas" con  $[^{125}I]$  glucagón y solubilizadas posteriormente con Lubrol PX, daban origen a dos componentes separables, por un lado la adenilato ciclasa y por otro lado el glucagón unido a proteína cuya velocidad de disociación podía ser incrementada por GTP.

Una gran información sobre esta problemática se ha obtenido a través del empleo de análogos del GTP resistentes a la hidrólisis: Gpp (NH)p, Gpp (CH<sub>2</sub>)p, GTP- $\gamma$ -S. Estos originan la activación de la adenilato ciclasa en ausencia de hormona, esta activación es frecuentemente mayor que la causada por el F<sup>-</sup> o por GTP mas hormona, y es muy poco reversible (84). Se demostró posteriormente que la hormona producía un incremento en la velocidad de activación de la adenilato ciclasa por el Gpp (NH)p, sin modificar la

CAPITULO	I	PAGINA	18	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

actividad final alcanzada (85).

En medio de las especulaciones que ya se estaban realizando en torno al posible papel de la hidrólisis del GTP como un mecanismo de regulación de la adenilato ciclasa, Cassel y Selinger (86) descubrieron en membranas de eritrocito una actividad hidrolítica del GTP (GTPasa), estimulable por catecolaminas. Posteriormente, los mismos autores observaron que la enterotoxina del cólera, la cual activa las adenilato ciclasas sensibles a hormona, inhibía marcadamente dicha actividad (87).

En base a sus hallazgos, estos autores propusieron un modelo (figura 4) según el cual se propone que la especie activa es el complejo adenilato ciclasa-GTP, la hidrólisis del nucleótido por la actividad GTPasa disminuye la actividad de la enzima al formarse el complejo inactivo adenilato ciclasas-GDP.

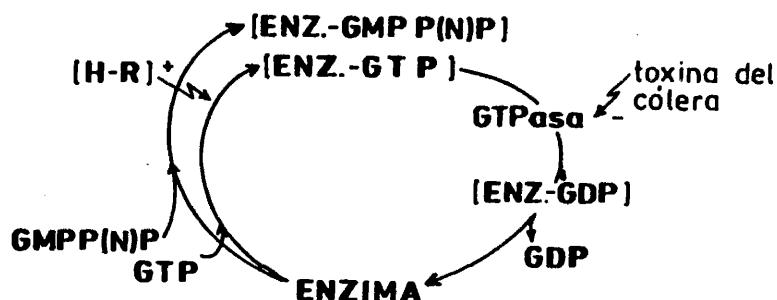


Figura 4. Modelo propuesto por Cassel y Selinger para explicar la activación de la adenilato ciclasa por GTP y GMP-P(N)P  
 + = estimulación                      - = inhibición

CAPITULO I	PAGINA 19	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

De acuerdo con este modelo, la inhibición de la hidrólisis del GTP por la enterotoxina del cólera o el reemplazo del GTP por un análogo resistente a la hidrólisis, originarían una sustancial activación de la adenilato ciclasa.

La clave del papel concreto desempeñado por la hormona en este mecanismo, surgió del descubrimiento de que la enzima activada en forma persistente por hormona más Gpp(NH)p, puede ser llevada a su estado basal de actividad después de una incubación con hormona mas GTP. De esta observación se dedujo que la hormona aumenta la velocidad de liberación del análogo del sitio regulador (88). Esto fué ratificado por experimentos posteriores en los que se demostró que el [<sup>3</sup>H] GDP que permanecía unido a la membrana, por preincubación previa con [<sup>3</sup>H] GTP, podía ser liberado al medio más rápidamente en presencia de hormona. En base a estos experimentos se sugirió que en presencia de GTP, la hormona a través del receptor facilita la liberación del GDP ligado a la adenilato ciclasa, entrando en su lugar el GTP; así pues, la hormona aceleraría la velocidad de recambio de ambos nucleótidos, manteniendo una mayor proporción de la enzima en su estado activo (89).

Una cuestión importante de este modelo es que explica, cómo la adenilato ciclasa puede ser regulada desde ambos lados de la membrana celular, por el lado externo mediante la activación hormonal del receptor, y por el lado interno, a través de agentes capaces de bloquear o modificar la actividad GTPasa (90), como por ejemplo, la enterotoxina del cólera.

Cabe señalar, no obstante, que la actividad GTPasa estimulable por hormona, se ha ensayado exclusivamente en eritrocito de pavo y sólo con agonistas  $\beta$  adrenérgicos. Una prueba más generalizada y concluyente deberá realizarse quizás en un sistema reconstituido.

El concepto de un ciclo regulador debido a la actividad GTPasa, ha proporcionado una herramienta para el análisis de la regulación de la adenilato ciclasa que durante veinte años fué una incógnita.



CAPITULO I	PAGINA 20	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

## VII. ACTIVACION POR TOXINA DEL COLERA

El cólera es una enfermedad provocada por una toxina excretada - por Vibrio cholerae. Esta proteína, activa la adenilato ciclase, - sensible a hormonas de prácticamente todas las células animales - estudiadas (91).

En los enfermos afectados, origina en las células del epitelio in - testinal un aumento marcado y persistente de AMP cíclico, lo cual produce un incremento en la secreción de fluido a la luz del in - testino y una grave deshidratación (92) (93).

La molécula de la toxina está constituida por dos subunidades de 29000 D. (proteína A) y 54000 D. (proteína B). A su vez, la pro - teína A, está formada por dos subunidades de 25000 D. ( $A_1$ ) y 7000 D. ( $A_2$ ), cuya interacción en la molécula se realiza por puentes di - sulfuro (101).

Para la toxicidad se requiere de la toxina nativa, sin embargo, pa - ra que ésta sea activa, en sistemas libres de células se requiere sólo del fragmento  $A_1$  (94).

La secuencia de acontecimientos implicados en la acción de la to - xina se inicia con la interacción de la misma con su receptor en la membrana plasmática. Este receptor, el monosialo-gangliósido -  $GM_1$ , está presente en la membrana plasmática de casi todas las cé - lulas de mamíferos; su interacción con la toxina se produce a ni - vel de la proteína B (91) (95).

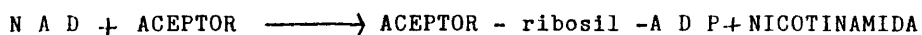
En el citoplasma, la proteína A se separa del complejo gangliósido - proteína B, y se produce la reducción de los puentes disulfuro que conectan las subunidades  $A_1$  y  $A_2$ : la primera de ellas es la - que finalmente origina la activación de la adenilato ciclase (96) (94).

En 1975 (96), se descubrió que el NAD es un factor requerido pa - ra la acción de la toxina.

Recientemente se demostró, que la subunidad activa de la toxina - tiene actividad de adenosina difosfato ribosil transferasa (E.C.

CAPITULO I	PAGINA 21	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

3.2.2.5.), es decir, es capaz de catalizar la siguiente reacción, llamada comúnmente ADP ribosilación (97) (98):



Se supone que, en el caso de la toxina del cólera, el aceptor sería la GTPasa asociada a la adenilato ciclase, la cual quedaría - inhibida mientras que la adenilato ciclase se mantendría permanentemente en el estado activo unida al GTP (87).

Esta hipótesis ha sido reforzada con el estudio más detallado de los componentes del sistema adenilato ciclase (99).

#### VIII. COMPONENTES PROTEICOS DEL SISTEMA ADENILATO CICLASE SENSIBLE A HORMONAS

Como una primera hipótesis de trabajo para el estudio de la adenilato ciclase, Robinson, Butcher y Sutherland, propusieron en 1967 (66) un modelo que asumía para la enzima la existencia de dos subunidades con una orientación direccional específica (Fig. 5).

Por el lado externo de la membrana, el receptor interaccionaría con la hormona correspondiente, lo cual alteraría de alguna forma la unidad catalítica en la cara interna de la membrana, originando un incremento en la actividad de la enzima.

Después de muchas experiencias, hoy en día se admite plenamente - que los receptores hormonales son proteínas individuales, distintas de la adenilato ciclase. Esta idea vino, en primer lugar, de estudios cinéticos de la activación de la enzima, particularmente en membranas de adipocitos, donde una variedad de hormonas parece competir por un número fijo de moléculas de adenilato ciclase (27) (100).

CAPITULO I	PAGINA 22	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

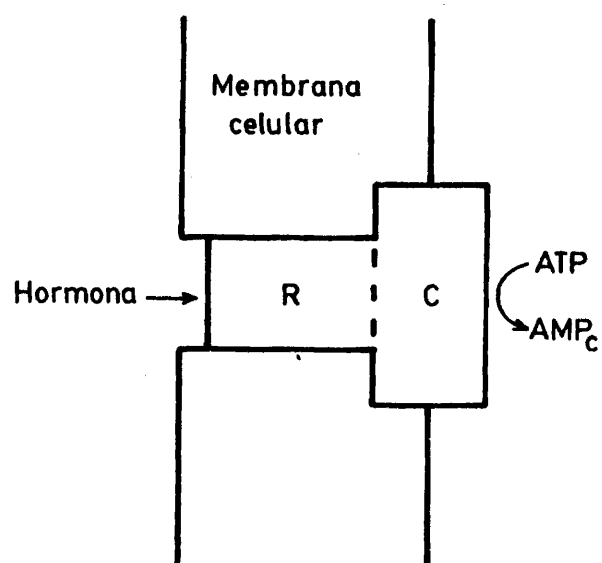


Figura 5. Modelo de Robinson y colaboradores de los componentes protéicos del sistema adenilato ciclasa asociado a membrana.

CAPITULO I	PAGINA 23	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

Otros argumentos referentes a la no identidad de los receptores - hormonales y la enzima surgieron de la observación de su independiente regulación ontogénica (101) (102).

Por otra parte, Scharamm (103), demostró con eritrocitos de ave - que la N - etilmaleimida que inactivaba la enzima no destruía la capacidad de unión de ligandos a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, y que la N,N diciclohexilcarbodiimida inactivaba los sitios de -- unión para el ligando  $\beta$ -adrenérgico iodohidroxibenzilpindolol, a concentraciones que no afectaban a la enzima (104).

Limbird (105) y Haga (106), lograron separar ambas entidades, es decir, el receptor por un lado y la actividad catalítica por otro mediante filtración en gel y centrifugación en gradientes de sacarosa.

Un modelo alternativo al propuesto por Sutherland y colaboradores introducía una entidad con la función de intermediario entre el - receptor y la unidad catalítica (107). Con esta última idea, Rodbell (110) (108), describió un modelo para el sistema adenilato - ciclasa, compuesto por un discriminador hormonal o receptor, un - transductor y un amplificador o unidad catalítica (Fig. 6).

La presencia de este transductor o proteína reguladora capaz de - establecer un nexo de unión entre los sucesos ocurridos a nivel - del receptor en la cara externa de la membrana y la subsecuente - activación de la entidad catalítica, no tenía mucho soporte experimental; cuando poco después, Rodbell demostró el requerimiento de nucleótido de guanina para la activación hormonal de la adenilato ciclasa, se supuso que el sitio de unión de éstos estaría en este presumible componente regulador del sistema.

En 1977, Pfeuffer demostró que una proteína con capacidad de unir nucleótidos de guanina, podía separarse de la unidad catalítica - mediante el empleo de un derivado de GTP-sepharosa. La actividad enzimática que no se absorbía a la matriz de afinidad, era muy poco estimulable por fluoruro o nucleótidos de guanina. Estas actividades se restauraban al agregar la fracción sin actividad catalítica, eluida del soporte de afinidad con un nucleótido de gua-

CAPITULO	I	PAGINA	24	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

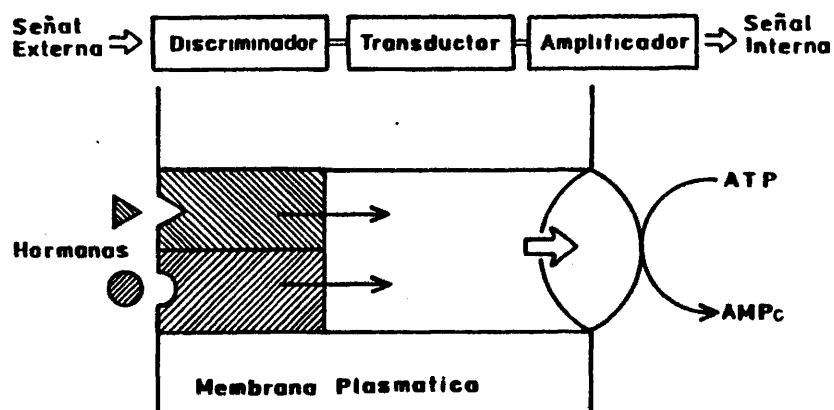


Figura 6. Modelo hipotético de Rodbell y colaboradores sobre el sistema adenilato ciclasa, constituido por tres componentes.

CAPITULO I	PAGINA	25	INTRODUCCION
------------	--------	----	--------------

nina (109). A pesar de que la separación no fué completa, este -  
fué el primer argumento concreto acerca de la existencia de dos -  
proteínas distintas en la adenilato ciclasa estimulable por fluo-  
ruro o por nucleótidos de guanina. Debido a que la cromatografía  
de afinidad estaba basada en la unión del ligando regulador, el -  
GTP, y considerando que la actividad residual en la fracción no -  
absorbida a la matriz tenía muy disminuida su respuesta al fluoru  
ro y al Gpp(NH)p, Pfeuffer dedujo que la subunidad regulatoria de  
la enzima permaneció unida al soporte de agarosa, y la proteína -  
catalítica estaba presente en la fracción no absorbida.

Cassel y Pfeuffer, observaron que cuando incubaban membranas de -  
eritrocito con la toxina del cólera y ( $^{32}\text{P}$ ) NAD, la radiactividad  
se incorporaba a tres proteínas especificadas de la membrana. Una  
vez solubilizadas, se demostró que una de ellas de peso molecular  
42000 D., se unía a la matriz de GTP-sepharosa y que con la adi-  
ción de esta fracción se lograba recuperar la activación por GTP  
de la fracción de la adenilato ciclasa que no se había unido a la  
columna de afinidad (110). Esto, no sólo apoyaba la idea de que  
la toxina podría actuar a través de una reacción de ADP ribosila-  
ción, sino que el sustrato de dicha reacción podía ser el compo -  
nente por el cual el GTP modula la actividad de la adenilato ci -  
clasa.

#### VIII.1. ANALISIS GENETICO

Un interesante y valioso enfoque del estudio de los componentes -  
de la adenilato ciclasa, ha sido el desarrollado principalmente -  
por Ross y Gilman en los últimos cinco años, trabajando con dis -  
tintas variantes de células del linfoma S49 (38).

Estas células mueren por elevada concentración intracelular de -  
cAMP, así pues, agonistas  $\beta$  adrenérgicos o la toxina del cólera -  
que activan la adenilato ciclasa "in vivo", pueden usarse para se

CAPITULO I	PAGINA 26	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

leccionar variantes afectadas en el sistema adenilato ciclasa - sensible a hormonas (111).

Históricamente, la primera variante con una lesión que afectase la actividad de la adenilato ciclasa, se seleccionó en un medio que contenía isoproterenol y un inhibidor de la fosfodiesterasa (112).

En esta variante, denominada cyc<sup>-</sup>, la actividad adenilato ciclasa es sólo medible en presencia de  $Mn^{+2}$ , menos del 10 % de esta actividad se detecta con MgATP como sustrato (113).

Por otra parte, esta actividad dependiente de  $Mn^{+2}$  es insensible a: hormonas, nucleótidos de guanina, toxina del cólera o fluoruro (113).

Los primeros trabajos para comprender la naturaleza de la lesión en cyc<sup>-</sup>, dieron cuenta que dicha lesión no estaba localizada a nivel del receptor, ya que esta variante retenía los receptores  $\beta$  adrenérgicos (114).

Ross y colaboradores demostraron que cuando calentaban a 37° C - un extracto de membranas plasmáticas de la cepa salvaje de S49, la actividad adenilato ciclasa decaía con el tiempo, sin embargo, si este extracto calentado lo suplementaban con membranas de cyc<sup>-</sup> la mezcla desarrollaba no sólo actividad basal, sino que la misma era estimulable por fluoruro o Gpp(NH)p. Esto no ocurría si las membranas de cyc<sup>-</sup> eran previamente incubadas a 37° C (115). De estos experimentos y de acuerdo con las cinéticas de inactivación de la adenilato ciclasa por la temperatura, estos autores - propusieron la existencia de al menos dos componentes para que - la enzima pudiera desarrollar su actividad basal en presencia de MgATP y que la misma fuera activable por fluoruro a Gpp(NH)p. Un componente sería más lábil a la temperatura y estaría presente - en cyc<sup>-</sup>, el otro más estable estaría ausente en esta variante y en los experimentos de reconstitución sería aportado por las membranas de la cepa salvaje.

Poco después los mismos autores demostraron que el componente -

CAPITULO I	PAGINA 27	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

termolabil capaz de desarrollar actividad adenilato ciclasa dependiente de  $Mn^{+2}$  en  $cyc^-$  es el componente catalítico, al que se designa generalmente con la letra C, y concluyeron que el componente termoestable es: Necesario para la expresión de la actividad en presencia de MgATP, el sitio de acción del fluoruro y los nucleótidos de guanina y un factor esencial de acoplamiento para la regulación hormonal de la actividad catalítica (113) (116).

A este componente termoestable se le denomina en forma generalizada, componente regulador y se le suele designar con la letra N por ser el sitio de unión de los nucleótidos de guanina.

El hepatoma HC-1, derivado de la línea HTC, es fenotípicamente muy similar a la variante  $cyc^-$  de S49, pero a diferencia de ésta carece de actividad de adenilato ciclasa, medida tanto con  $Mg^{+2}$ , como  $Mn^{+2}$  (117). Al igual que ocurría con las membranas de la cepa salvaje de S49, un extracto de membranas de HC-1 es capaz de reconstituir la actividad adenilato ciclasa en presencia de  $Mg^{+2}$  cuando es añadido a una suspensión de membranas de  $cyc^-$ , esto indicaba que HC-1 contendría el componente N pero el C estaba inactivo (113).

Haga y colaboradores (113) aislaron una segunda variante de S49 afectada en el sistema adenilato ciclasa, a esta variante se la denominó UNC y fué seleccionada en agar conteniendo terbutalina (un agonista  $\beta$ adrenérgico resistente a la oxidación) o inhibidores de la fosfodiesterasa. Estas células retienen actividad de adenilato ciclasa en sus membranas, siendo la misma, estimulable por fluoruro o Gpp(NH)p en presencia de  $Mg^{+2}$  y por toxina del cólera. No obstante, las células han perdido la capacidad de respuesta a agonistas  $\beta$ adrenérgicos y a prostaglandinas E1 y E2. Dado que estas células conservan intactos sus receptores, la lesión parece estar localizada en algún componente relacionado con el acoplamiento del receptor y la enzima (113).

La capacidad de respuesta a hormonas se restablece al suplementar las membranas de UNC con extractos de células normales, pero no con extractos de  $cyc^-$  (119). Esto estaría indicando que la



CAPITULO I	PAGINA 28	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

lesión de UNC representa una modificación tal en el componente N que no le permite actuar como factor de acoplamiento entre el receptor y el componente catalítico, pero conserva la capacidad de conferirle a la enzima la dependencia de  $Mg^{+2}$ .

Una tercera clase de variantes de células del linfoma S49 afectada en el sistema adenilato ciclasa, sensible a hormonas, es la denominada  $\beta_d$ , deficiente en receptores  $\beta$  adrenérgicos (114). La enzima en esta variante responde normalmente al fluoruro, toxina del cólera y nucleótidos de guanina, además presenta una respuesta normal a PG1.

En experimentos de unión de [ $^{125}I$ ] iodohidroxibenzilpindolol a las membranas de  $\beta_d$  se pudo demostrar que el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos estaba disminuido en proporción directa a la pérdida de la correspondiente respuesta hormonal.

Así pues, hoy en día se asume que la adenilato ciclasa sensible a hormonas, consta al menos de tres clases de proteínas: Los receptores (R), la proteína reguladora (N) y el componente catalítico (C) (120).

## VIII.2 EL RECEPTOR

El receptor, como ya se ha indicado anteriormente, posee el sitio de unión de las hormonas en la cara externa de la membrana plasmática, pudiendo existir uno o varios receptores diferentes en una misma célula.

Los receptores para las catecolaminas han sido los más intensamente estudiados. Hace más de treinta años, Ahlquist sugirió que estos receptores podían dividirse en dos grandes grupos, según el orden de afinidad con el que interaccionaban diferentes agonistas y se les denominó receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos (121).

En la pasada década, por criterios farmacológicos, los receptores  $\beta$  adrenérgicos fueron subdivididos en  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , los cuales están

CAPITULO I	PAGINA 29	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

generalmente asociados con efectos estimuladores de la actividad de la adenilato ciclasa (122).

Igualmente por criterios farmacológicos, se subdividió a los receptores  $\alpha$  adrenérgicos en  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (123). Los receptores  $\alpha_1$  están asociados con efectos estimuladores de la actividad adenilato ciclasa (124), pero el mecanismo molecular de esta estimulación está menos caracterizado que para el caso de los receptores  $\beta$  adrenérgicos. Los receptores  $\alpha_2$ , por el contrario, a menudo ejercen efectos inhibitorios sobre la adenilato ciclasa, como por ejemplo, en plaquetas humanas (125).

La caracterización molecular de los receptores adrenérgicos se ha llevado a cabo en diferentes especies y tejidos. Recientemente, el uso de anticuerpos monoclonales y técnicas de reconstitución han acelerado sustancialmente estos estudios (126).

### VIII,3. EL COMPONENTE REGULADOR (N)

De las experiencias descritas anteriormente se puede resumir para el componente regulador de la adenilato ciclasa que:

- Confiere al componente catalítico la capacidad de usar MgATP como sustrato
- Es el sitio de interacción del fluoruro y los nucleótidos de guanina
- Participa en el acoplamiento del receptor con el componente catalítico
- Contiene el sitio para la activación de la enzima por la toxina del cólera, presumiblemente por su ADP-ribosilación

Las primeras experiencias encaminadas a la caracterización mole-

CAPITULO I	PAGINA 30	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

cular del componente regulador, se realizaron en extractos crudos de membranas de eritrocito. Al "marcar" estas membranas con ( $^{32}\text{P}$ )GTP- $\gamma$ -azidoanilida, se reveló la presencia de una proteína de peso molecular 42000 D. que podía ser parte integrante del citado componente (109).

Posteriormente, el estudio de las propiedades hidrodinámicas de N en extractos de membranas de células del linfoma S49, determinó para el mismo, un peso molecular de 130000 D. (127), su presencia era detectada por su capacidad para reconstituir la actividad de adenilato ciclasa, dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$ , en extractos de membranas de células de la variante cyc<sup>-</sup>, en la cual este componente está ausente.

Cuando los estudios hidrodinámicos se realizaron en presencia de  $\text{F}^-$  o Gpp(NH)p, se obtenía para N un peso molecular de 90000 D., este resultado llevó a los autores a pensar la posible existencia de un equilibrio entre distintas subunidades de N modulado por  $\text{F}^-$  o Gpp(NH)p.

Recientemente, el mismo grupo, trabajando con membranas de hígado llevó a cabo la purificación del componente regulador (99). El análisis de la preparación purificada en geles de SDS-poliacrilamida, reveló la presencia de tres proteínas, de pesos moleculares 52000, 45000 y 35000 D.

Se cuenta con ciertas evidencias, para pensar que las tres proteínas son necesarias para que el componente regulador manifieste su actividad. Cuando éste fué incubado en presencia de toxina del cólera y ( $^{32}\text{P}$ )NAD, sólo las dos primeras proteínas de 52000 y 45000 D. fueron marcadas.

Una observación que confirma esta composición subunitaria de N es que cuando se "marcan" las membranas de las células del linfoma S49 con ( $^{32}\text{P}$ )NAD y toxina del cólera, se visualizan de nuevo dos proteínas, correspondientes a un peso molecular de 52000 y 45000 D.; ésto no ocurre cuando se usan membranas de la variante cyc<sup>-</sup> (129).

CAPITULO I	PAGINA 31	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

Del comportamiento en el electroenfoque de estas dos proteínas - en la variante UNC, se dedujo que eran más acídicas que en la cepa salvaje, lo cual podría en parte explicar las anomalías funcionales del componente regulador en esta variante (130).

Existen algunas diferencias funcionales en las propiedades de N cuando está enriquecido en una u otra de sus subunidades (131). Actualmente se especula sobre la posibilidad de que N pueda existir como un complejo de diferente composición subunitaria y con diferentes propiedades funcionales.

La preincubación de N con fluoruro o GTP- $\gamma$ -S origina la formación de una especie más activa y estabilizada, este estado activo de N puede ser revertido, lo que contrasta con la práctica irreversibilidad del efecto producido sobre N cuando la preincubación se realiza con la membrana intacta (128)(131).

Con el componente regulador purificado se ha determinado, por una parte, que es, efectivamente, sustrato de la modificación covalente por la toxina del cólera y por otra que existe una buena correlación entre la extensión de dicha modificación y el grado de activación de N (128).

#### VIII,4 EL COMPONENTE CATALITICO (C)

Se conoce poco acerca de las propiedades del componente catalítico, debido a su labilidad y a las dificultades que lleva su purificación.

Los estudios previos sobre la solubilización y resolución de los diferentes componentes de la adenilato ciclasa, se realizaron con detergentes no iónicos, del tipo del Lubrol o Tritón (38), que, generalmente, no permitían una completa separación de C y N.

La mejor preparación del componente catalítico para su caracterización se obtuvo de un extracto puro de membranas plasmáticas de

CAPITULO I	PAGINA 32	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

la variante  $cyc^-$  del linfoma S49 (113)(115). De esta manera se pudo determinar para este componente que:

- la actividad de la adenilato ciclasa con Mg-ATP, es menos del 10 % de la actividad con MnATP.
- esta actividad es insensible a hormonas, fluoruro o nucleótidos de guanina.
- es sensible al calentamiento suave y a bajas concentraciones de reactivos de grupos sulfhidrilo.

Ross y colaboradores determinaron para el componente catalítico de  $cyc^-$  un peso molecular de 190000 D. (113).

La separación de C y N se ha podido conseguir recientemente, después de solubilizar la adenilato ciclasa de hígado con colato, a alta fuerza iónica (132). Estas condiciones de solubilización - permiten por una parte, una mayor estabilidad del componente catalítico, y por otra, su agregación específica.

Esto permite su fácil separación de N por filtración en gel.

Las propiedades estudiadas con esta preparación de C son semejantes a las descritas previamente en la variante  $cyc^-$  de S49.

Cabe señalar en este punto que la adenilato ciclasa soluble de - testículo dependiente de  $Mn^{+2}$ , tiene un peso molecular de 70000 D., pero su relación con C está cuestionada por el hecho de que no ha sido posible detectar actividad de adenilato ciclasa en - presencia de ATP en un sistema reconstituido con N (113).

#### XI. PAPEL DESEMPEÑADO POR LOS CATIONES DIVALENTES EN LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA

CAPITULO I	PAGINA 33	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

Para que la adenilato ciclasa pueda expresar su actividad catalítica, se requiere de la presencia de un catión divalente en el medio de ensayo, el cual puede ser tanto el  $Mg^{+2}$  como el  $Mn^{+2}$ . Se ha demostrado que el sustrato efectivo de la enzima es el complejo formado por el ATP con uno u otro de estos cationes (27). El  $Mn^{+2}$  es generalmente más efectivo que el  $Mg^{+2}$ , de tal forma que la concentración requerida de  $Mn^{+2}$  para observar la máxima actividad de la enzima, es menor que la del  $Mg^{+2}$ .

El exceso de catión divalente sobre la concentración de ATP se traduce en un incremento de la actividad de la adenilato ciclasa (27), y se ha sugerido la existencia de un "sitio metálico" distinto del sitio catalítico donde el  $Mg^{+2}$  o el  $Mn^{+2}$  podrían ejercer un papel regulador (44) (133).

La adenilato ciclasa de determinadas fuentes, tales como algunos organismos eucariotes inferiores (13), testículo de rata (134) y ciertas variantes de líneas celulares (38), es exclusivamente dependiente de  $Mn^{+2}$ . Esta dependencia exclusiva de  $Mn^{+2}$  para la expresión de la actividad catalítica de la adenilato ciclasa es aparentemente, una consecuencia de la ausencia o disfuncionalidad del componente regulador de la enzima, ya que éste confiere a la unidad catalítica la capacidad de usar MgATP como sustrato (38).

#### IX.1. EFECTOS DEL $Ca^{+2}$ .

La hipótesis de que las fluctuaciones intracelulares de  $Ca^{+2}$  pueden regular la actividad de la adenilato ciclasa, está basada en los efectos inhibidores y activadores de este catión sobre la actividad de la enzima, observados en diferentes tejidos.

En eritrocito de pavo, se demostró que el  $Ca^{+2}$  disminuía la velocidad máxima de la actividad de la adenilato ciclasa dependiente de  $Mg^{+2}$  y estimulada por catecolaminas, sin afectar la afinidad

CAPITULO I	PAGINA 34	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

de la enzima por la hormona o por el sustrato (135). Los estudios cinéticos efectuados por el grupo de Levitzki (135)(136), sugirieron que el  $\text{Ca}^{+2}$  actúa como un efector alostérico negativo - al unirse a sitios específicos de la enzima. Estos sitios son - distintos de aquellos por los que el  $\text{Mg}^{+2}$  ejerce los efectos - alostéricos positivos. En presencia de  $\text{Mn}^{+2}$ , no se observan los efectos inhibitorios del  $\text{Ca}^{+2}$ , probablemente, en razón de su competencia por los mismos sitios de unión en la enzima.

Los efectos inhibidores del  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la adenilato ciclase se - han puesto de manifiesto en diferentes tejidos y afectan tanto - la actividad basal como la actividad estimulada por diversos - efectores, por este motivo se ha llegado a suponer que el sitio de interacción del  $\text{Ca}^{+2}$  con la adenilato ciclase estaría localizado en el componente catalítico de la enzima.

Por otra parte, los efectos activadores del  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la actividad de la adenilato ciclase han sido objeto de intensos estudios habiéndose efectuado la mayor parte de ellos con la enzima de cerebro (137).

La adenilato ciclase de cerebro experimenta una respuesta bifásica al  $\text{Ca}^{+2}$  (137), siendo activada a bajas concentraciones e inhibida a una mayor concentración del catión.

El efecto activador del  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la actividad adenilato ciclase se demostró en la corteza cerebral, donde se observó que el EGTA inhibe la actividad de la enzima en un 60 % y que dicha inhibición podía ser revertida por  $\text{Ca}^{+2}$ , pero no por  $\text{Mg}^{+2}$  (138). Los efectos inhibitorios del EGTA son no competitivos con respecto al sustrato, MgATP.

En la fracción sinaptosomal, la actividad adenilato ciclase es - estimulada casi tres veces por  $\text{Ca}^{+2}$ , en una concentración inferior a  $50 \mu\text{M}$ , sin embargo, concentraciones del catión por encima de  $300 \mu\text{M}$ , tienen efectos inhibitorios (139).

El efecto activador del  $\text{Ca}^{+2}$  afecta no sólo la actividad basal - de la enzima, sino también la velocidad de estimulación por nu -

CAPITULO I	PAGINA 35	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

cleótidos de guanina y la respuesta a determinadas hormonas.

Rodbell y sus colaboradores demostraron que el EGTA bloqueaba la activación de la adenilato ciclase de células grasas por ACTH, pero no la activación mediada por adrenalina o glucagón (140).

## IX.2. CALMODULINA Y ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA

El  $\text{Ca}^{+2}$  está implicado en la regulación de una gran variedad de sistemas enzimáticos y en la mayor parte de los mecanismos de motilidad celular (141).

La posibilidad de que el  $\text{Ca}^{+2}$  no actuara como catión libre, sino a través de su asociación con una proteína específica, fué suge-rida por Meyer en 1964 (142).

Más tarde, Cheung, durante la purificación de la fosfodiesterasa de cerebro bovino, encontró que un factor activador endógeno se disociaba de la enzima (143).

Este modulador requiere la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  para su acción(144) y afecta diversas actividades enzimáticas, como puede observarse en la tabla III.

Debido a su requerimiento absoluto de  $\text{Ca}^{+2}$  y por ser, posiblemente el principal receptor intracelular del mismo, este factor fué denominado calmodulina.

La calmodulina es un polipéptido de peso molecular 18000 D., de carácter ácido y de estructura flexible. Posee cuatro sitios de unión para el  $\text{Ca}^{+2}$ , mediante los cuales, aunque con menor afinidad, puede también unir  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ .

La unión del  $\text{Ca}^{+2}$  a la calmodulina provoca un cambio conformacio-nal que resulta en un aumento de la porción helicoidal de la mo-lécula (145).

El mecanismo general de acción de la calmodulina sobre una enzi-ma E, consta de dos etapas:



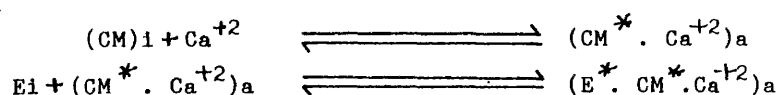
CAPITULO I	PAGINA 36	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

TABLA III

ENZIMAS Y PROCESOS CELULARES REGULADOS POR CALMODULINA

Adenilato ciclasa  
 Guanilato ciclasa  
 Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos  
 Proteína quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$   
 Quinasa de la Fosforilasa  
 Quinasa de la cadena ligera de la miosina  
 Fosforilación de membranas  
 ATP trifosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$   
 Funciones nucleares  
 Funciones postsinápticas  
 Quinasa de NAD  
 Desarmado de microtúbulos  
 Liberación de neurotransmisores

CAPITULO I	PAGINA 37	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------



Donde CM representa la calmodulina, el asterisco (\*), indica un cambio conformacional, el subíndice i designa un estado inactivo y el subíndice a designa un estado activo.

Tanto el EGTA que compleja  $\text{Ca}^{+2}$ , como el agente antipsicótico - trifluoroperazina que se une al complejo  $\text{Ca}^{+2}$ .calmodulina, son - inhibidores de la acción dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ .

El efecto de la calmodulina ha sido bien caracterizado en cuanto a su acción sobre la fosfodiesterasa, donde se ha demostrado la formación de un complejo activo en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  (146).

La implicación de la calmodulina en los efectos activadores del  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la adenilato ciclase de cerebro, fué demostrada por - Brostrom (147) y Cheung (148).

Estos autores separaron la adenilato ciclase de la calmodulina - endógena por cromatografía en una resina de intercambio aniónico y pudieron demostrar de esta forma el efecto activador de calmodulina exógena sobre la enzima eluida. La unión de la calmodulina a la adenilato ciclase es reversible, ya que ambas proteínas pueden ser separadas por filtración en gel.

Se ha demostrado en el cerebro la existencia de dos formas distintas de la adenilato ciclase, una capaz de experimentar los - efectos activadores mediados por calmodulina, y otra forma insensible a los mismos (145). Sin embargo, ambas formas de la enzima son inhibidas a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$ .

La razón de la existencia de estas dos formas de la adenilato ciclase en relación con su dependencia de calmodulina se desconoce.

El grupo de Wolff (137) examinó en detalle las propiedades de la calmodulina de cerebro, en relación con la unión de cationes divalentes, y se estableció la existencia de dos clases de sitios de unión para el  $\text{Ca}^{+2}$ , uno denominado sitio clase A, con una ca-

CAPITULO I	PAGINA 38	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

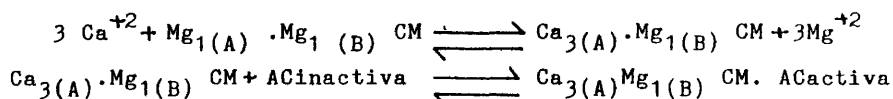
pacidad de unión de 3 moles/mol de calmodulina y una  $K_d$  de 0,2  $\mu$ M; y otro sitio denominado clase B, con una capacidad de unión de 1 mol/mol de calmodulina y una  $K_d$  de 1  $\mu$ M.

El  $Mg^{+2}$  y el  $Mn^{+2}$  pueden también unirse a estos sitios pero con constantes de disociación mayores.

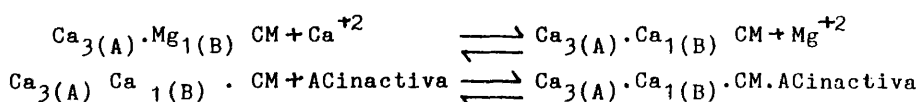
En base a estos resultados, los mismos autores sugieren que la respuesta bifásica al  $Ca^{+2}$  de la adenilato ciclasa de cerebro es mediada en todo el rango de concentración del catión, por calmodulina. Para ello suponen que en ausencia de  $Ca^{+2}$  y en presencia de una concentración fisiológica de  $Mg^{+2}$ , la calmodulina se encontraría formando un complejo inactivo tetramagnésico con éste último catión, tres de ellos ocuparían los sitios clase A y uno ocuparía el sitio clase B. A baja concentración de  $Ca^{+2}$ , éste se desalojaría al  $Mg^{+2}$  de los sitios clase A, permaneciendo un  $Mg^{+2}$  unido al sitio clase B que posee menos afinidad por  $Ca^{+2}$ . Este complejo tricálcico-magnésico de la calmodulina sería la especie capaz de activar la adenilato ciclasa.

A altas concentraciones de  $Ca^{+2}$ , este catión podría reemplazar al  $Mg^{+2}$  en el sitio clase B, originándose un complejo tetracálcico con la calmodulina, que tendría efectos inhibitorios sobre la actividad de la adenilato ciclasa. Las interacciones propuestas pueden resumirse en la siguiente secuencia de reacciones:

- A baja concentración de  $Ca^{+2}$



- A alta concentración de  $Ca^{+2}$



Donde CM representa la calmodulina y AC representa la adenilato

CAPITULO I	PAGINA 39	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

ciclasa.

El requerimiento de la unión de 3 moles de  $\text{Ca}^{+2}$  por mol de calmodulina para que ésta ejerza los efectos activadores sobre la actividad de la adenilato ciclasa, ha sido recientemente confirmado por Malnoë y colaboradores (149), sin embargo, la posible implicación de la calmodulina en los efectos inhibitorios del  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la actividad de la enzima no ha podido ser demostrada en forma concluyente.

Son varios los tejidos donde se ha observado recientemente una estimulación de la actividad adenilato ciclasa por calmodulina. Ausiello y colaboradores (150), determinaron el papel regulador de la calmodulina sobre la actividad adenilato ciclasa sensible a vasopresina, en una línea celular establecida de riñón porcino. Por otra parte, Ofulue y Nijjar (151), demostraron el papel activador de la calmodulina sobre la actividad adenilato ciclasa de pulmón de rata.

Una interesante cuestión suscitada a raíz del mayor conocimiento de los diferentes componentes del sistema adenilato ciclasa es la de considerar a qué nivel se produce la interacción de la calmodulina con la enzima. A este respecto, los estudios son aún preliminares y hasta la fecha no permiten una conclusión definitiva.

Tuscano y colaboradores (152), trabajando con la enzima de cerebro llegaron a sugerir, en base a los resultados obtenidos, que la activación de la adenilato ciclasa por calmodulina requería de la presencia del componente regulador de la enzima. Sin embargo, estudios recientes del grupo de Neer, demostraron que el componente catalítico separado del regulador es sensible a la activación por calmodulina (153).

Las implicaciones funcionales del efecto de la calmodulina sobre la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa aún no se conocen con exactitud. El flujo de  $\text{Ca}^{+2}$ , a través de la membrana plasmática o la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  asociado a ella en respuesta a un estímulo

CAPITULO I	PAGINA 40	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

lo, pueden activar la adenilato ciclasa, provocando un incremento en el nivel intracelular de cAMP. El aumento de concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en el citoplasma puede entonces activar la fosfodiesterasa para restaurar los niveles de cAMP a su estado basal. Así pues, la activación secuencial de las dos enzimas podría originar un aumento transitorio y local de los niveles de cAMP.

#### X. ESTRUCTURA DEL SISTEMA ADENILATO CICLASA SENSIBLE A HORMONAS

El descubrimiento de los distintos constituyentes del sistema de la adenilato ciclasa sensible a hormonas, así como el de los múltiples sitios de regulación, llevó a la consideración de que este sistema era más complejo de lo que se pensó en un principio (66).

Una representación esquematizada de los componentes del sistema y el probable sitio de acción de cada uno de los ligandos reguladores, se muestra en la figura 7.

La forma en la cual los distintos componentes están estructurados en el entramado lipídico de la membrana celular, se desconoce en la actualidad.

Estudios recientes llevados a cabo por el grupo de Rodbell, empleando la técnica de "inactivación por irradiación", sugieren la existencia en la membrana plasmática de agregados moleculares constituidos por el receptor y la proteína reguladora. Esta estructura oligomérica  $(\text{RN})_n$  podría existir separada físicamente del componente catalítico. La activación del sistema por hormonas y nucleótidos de guanina originaría la asociación de todos los componentes para conformar la holoenzima activa (154). (Esta hipótesis se discute más adelante).

CAPITULO	I	PAGINA	41	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

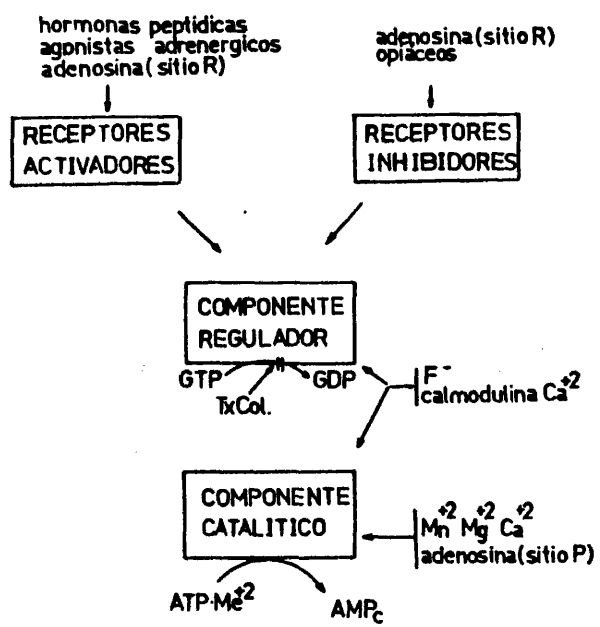


Figura 7. Representación esquemática de los componentes del sistema adenilato ciclasa y el probable sitio de acción de cada ligando o agente regulador.

CAPITULO I	PAGINA 42	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

# XI. ACOPLAMIENTO ENTRE EL RECEPTOR Y LA ADENILATO CICLASA

La modulación hormonal de la adenilato ciclasa se inicia con la unión de la hormona a un sitio específico del receptor, que está expuesto en el lado externo de la membrana plasmática. El receptor ocupado interacciona entonces, directa o indirectamente, con la adenilato ciclasa.

Hubo dos hipótesis en un principio que intentaron explicar cómo se podría realizar esta interacción. La primera de ellas suponía que el receptor y la enzima formaban parte de la misma entidad molecular, y la segunda postulaba que los receptores rodeaban a la adenilato ciclasa a modo de unidades regulatorias acopladas permanentemente a la enzima.

La primera hipótesis fué descartada al poderse separar fácilmente el receptor de la adenilato ciclasa (155).

De la segunda hipótesis, era cuestionable sobre todo, el hecho de que por ejemplo, en las células grasas cinco hormonas diferentes parecen interaccionar con la adenilato ciclasa (156), las cuales actúan mediante unión a su propio receptor. Si cada receptor debe estar ligado como una subunidad regulatoria a la misma enzima, resulta difícil imaginar cómo tales moléculas puedan agruparse físicamente en un único complejo en la membrana, manteniendo además la exposición hacia el exterior celular de cada componente receptor.

Por otra parte, semejantes complejos moleculares deberían ser detectados por las técnicas empleadas en la actualidad en microscopía electrónica para el estudio de proteínas de membrana.

En el año 1975, Cuatrecasas y colaboradores desarrollaron lo que se denomina el modelo del "receptor móvil" (155), el cual parte de la base de los conceptos sobre la naturaleza fluida y dinámica de la membrana celular expuestos por Singer y Nicolson (157).

En el modelo del receptor móvil, se sugiere que en ausencia de hormona, el receptor y la adenilato ciclasa son entidades separa

CAPITULO I	PAGINA 43	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

das capaces de experimentar una migración lateral independiente en el plano de la bicapa lipídica. Cuando la hormona se une al receptor aumenta la afinidad de éste por la enzima y se produce la asociación entre ambos (Fig. 8).

En el complejo multicomponente originado, el receptor es capaz - de modificar la actividad catalítica de la adenilato ciclasa.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de inactivación por irradiación para el caso del glucagón, son consecuentes con esta hipótesis.

Los estudios realizados, mostraron que en ausencia de hormona, - la enzima y el receptor eran inactivados como entidades independientes, pero la irradiación en presencia del glucagón originaba que el receptor y la adenilato ciclasa se inactivaban como una - única unidad funcional (158). La eliminación del glucagón después de la irradiación en el estado acoplado originó la disociación de ambos componentes, los cuales, a su vez, volvían a asociarse al añadir nuevamente la hormona.

Una interesante demostración apoyando la validez del modelo del "receptor móvil" se debe a los trabajos realizados por Schramm y sus colaboradores (159). Estos autores ensayaron la hipótesis - de que el receptor  $\beta$ adrenérgico es una unidad independiente que puede ser transferida de un sistema adenilato ciclasa a otro. Para ello utilizaron eritrocitos de pavo, en los cuales la actividad de la adenilato ciclasa había sido anulada por tratamiento - con N-etilmaleimida o por calor, y células de la eritroleucemia de Friend (células F), las cuales poseen una adenilato ciclasa - normal pero carecen del receptor  $\beta$ adrenérgico. Los eritrocitos cuya adenilato ciclasa había sido inactivada, fueron fusionados con las células F en presencia de virus Sendai. Las preparaciones celulares resultantes de la fusión, mostraron una actividad adenilato ciclasa estimulable por isoproterenol. La activación por isoproterenol apareció pocos minutos después de la fusión y aún en presencia de inhibidores de proteínas, con lo que quedó - demostrado que el acoplamiento se produjo entre elementos pre -



CAPITULO	I	PAGINA	44	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

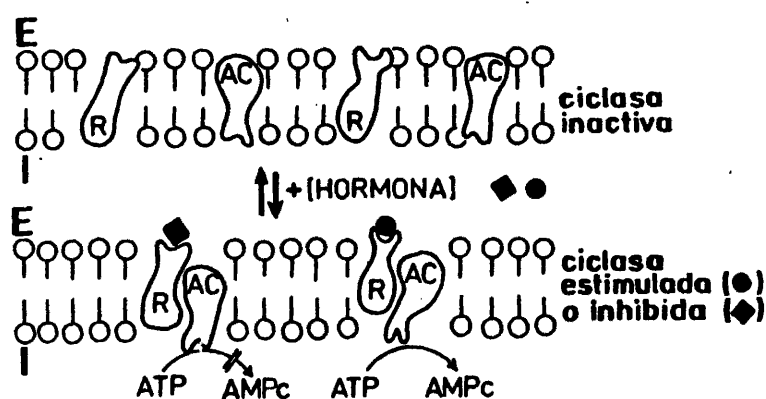


Figura 8. Hipótesis del receptor móvil para el mecanismo de modulación de la actividad adenilato ciclase por hormonas.  
 ● = hormona activante  
 ◆ = hormona inhibitoria  
 E = exterior celular  
 I = interior

CAPITULO I	PAGINA 45	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

existentes.

Repitiendo el mismo esquema experimental, el grupo de Schramm lo gró transferir receptores de prostaglandina  $E_1$  ( $PGE_1$ ) de células F, con su adenilato ciclase inactivada a células de tumor adrenal de ratón (Y-1), las cuales poseen adenilato ciclase pero carecen de los receptores mencionados.

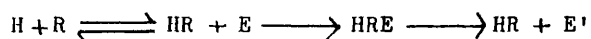
## XII. MECANISMO MOLECULAR DE LA MODULACION HORMONAL DE LA ADENILATO CICLASE

En el año 1977, Cassel y Selinger elaboraron el modelo ya comentado en el apartado VI, para explicar la regulación de la actividad adenilato ciclase por hormonas y nucleótidos de guanina. Este modelo se basaba fundamentalmente en el descubrimiento, en eritrocito de pavo, de una actividad GTPasa estimulable por catecolaminas (85).

Estos autores propusieron la existencia de un ciclo regulador de la adenilato ciclase, consistente en dos reacciones: primera, la formación de una especie activa, adenilato ciclase GTP inducida por la hormona; y segunda, la vuelta al estado inactivo, adenilato ciclase GDP mediada por la actividad GTPasa asociada a la adenilato ciclase (160)(fig. 4).

En el año 1978, Tolkovsky y Levitzki (161), trabajando con membranas de eritrocito de pavo, desarrollaron un estudio cinético detallado del mecanismo de activación de la adenilato ciclase mediado por el receptor  $\beta$  adrenérgico.

Estos autores propusieron la siguiente secuencia de reacciones:



El mecanismo propuesto fué denominado "acoplamiento por colisión"

CAPITULO	I	PAGINA	46	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

y posee las siguientes características:

- En el estado activado (E'), la enzima no se encuentra formando parte de un complejo con su receptor.
- El precursor de la forma activada de la enzima (HRE), se forma durante el encuentro transitorio entre el complejo receptor-hormona (HR) y la enzima (E). De la disociación de este complejo surge la forma activada de la enzima (E').
- El paso limitante en la activación enzimática es el encuentro entre receptor-hormona y la enzima, de tal forma que una vez producido éste, los pasos subsiguientes ocurren en forma muy rápida y la especie HRE nunca llega a acumularse.

La asociación entre el complejo receptor-hormona y la enzima se produce debido a la difusión de ambos componentes en el plano de la membrana, conforme a lo sostenido en la hipótesis del "receptor móvil". De hecho, a temperaturas bajas en las cuales tal difusión estaría impedida, la activación hormonal se anula completamente (161).

Los datos acumulados sobre los distintos componentes del sistema adenilato ciclasa llevaron en el año 1980 a Ross y Gilman a proponer un ciclo regulador para dicho sistema (38) el cual se representa gráficamente en la figura 9.

En el ciclo propuesto, quedan patentes los conceptos básicos del modelo de Cassel y Selinger, en el sentido de que la adenilato ciclasa asociada al GTP, sería la especie activa, y la hidrólisis del GTP sería el mecanismo de inactivación.

La diferencia entre este ciclo regulador y el modelo de Cassel y Selinger, reside en la forma por la cual la hormona facilitaría la regeneración de la especie activada. Ross y Gilman consideran que sería la disociación del GDP, en lugar de la unión del GTP, el paso regulador de dicha regeneración (162).

De tal forma que la acción relevante de la hormona es el mecanis

CAPITULO	I	PAGINA	47	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

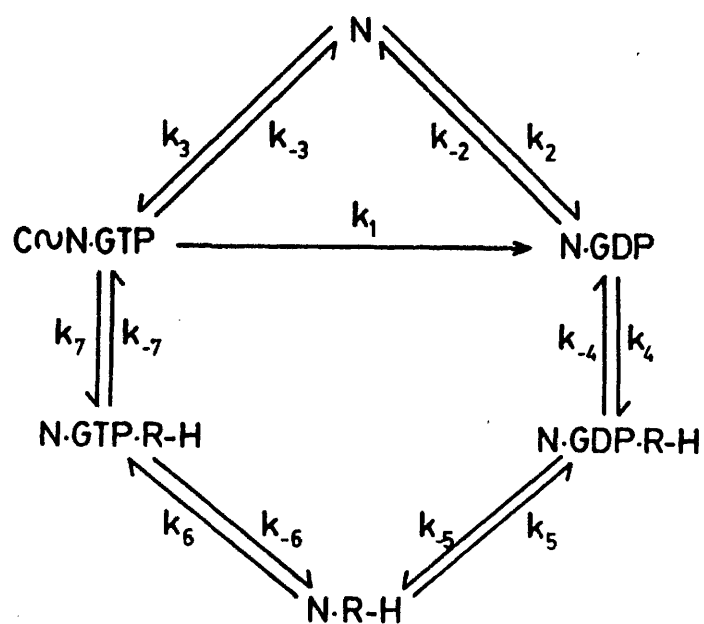


Figura 9. Hipotético ciclo regulador del sistema adenilato ciclasa, propuesto por Ross y Gilman.  
 N = Componente Regulador  
 C = Componente Catalítico  
 R = Receptor  
 H = hormona

CAPITULO I	PAGINA 48	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

mo de activación reside en la naturaleza heterotrópica negativa de su unión al complejo receptor-enzima, con respecto a los nucleótidos de guanina (78), de esto deducen los autores que el complejo N.GTP.RH como tal, tenga una existencia muy breve.

Según el modelo de Ross y Gilman, en ausencia de hormona (H),  $K_{-2}$  gobierna el paso limitante en la regeneración de la especie activa N.GTP y  $K_2 \gg K_{-2}$ . Si bien, termodinámicamente, el camino  $K_4$ ,  $K_5$ ,  $K_6$ ,  $K_7$  es equivalente al  $K_{-2}$ ,  $K_3$ . La ruta catalizada por el receptor es cinéticamente mucho más rápida (figura 9).

Hay pocos datos acerca de si el GTP promueve la asociación de N a C, o de si, meramente, activa un complejo NC preexistente (163) (164). Aunque en el modelo representado en la figura 9 se sugiere la primera de estas dos posibilidades, la segunda no puede ser descartada.

Como una nueva extensión de la hipótesis de Cassel y Selinger, Bourne y sus colaboradores (120), propusieron un modelo para explicar la modulación hormonal de la adenilato ciclasa muy semejante al anteriormente expuesto de Ross y Gilman, cuyo esquema se representa en la figura 10.

Según este modelo, el componente catalítico oscilaría entre una forma inactiva C que sintetizaría poco cAMP, y un complejo ternario activo  $N_{GTP} \cdot C$ . En el estado estacionario, la síntesis de cAMP, estaría reflejada por la concentración de  $N_{GTP} \cdot C$  la cual dependería de las velocidades relativas de su formación y degradación.

De acuerdo con este modelo, la degradación del complejo activo  $N_{GTP} \cdot C$  se produciría principalmente a través de la hidrólisis del GTP y posterior disociación del complejo  $N_{GTP} \cdot C$ . Si N ha sido modificado por la toxina del cólera, presumiblemente por ADP-ribosilación, esta inactivación es lenta y la síntesis de cAMP se ve incrementada.

De la misma manera, la velocidad de degradación sería muy baja en el caso de que análogos del GTP, resistentes a la hidrólisis,

CAPITULO I	PAGINA 49	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

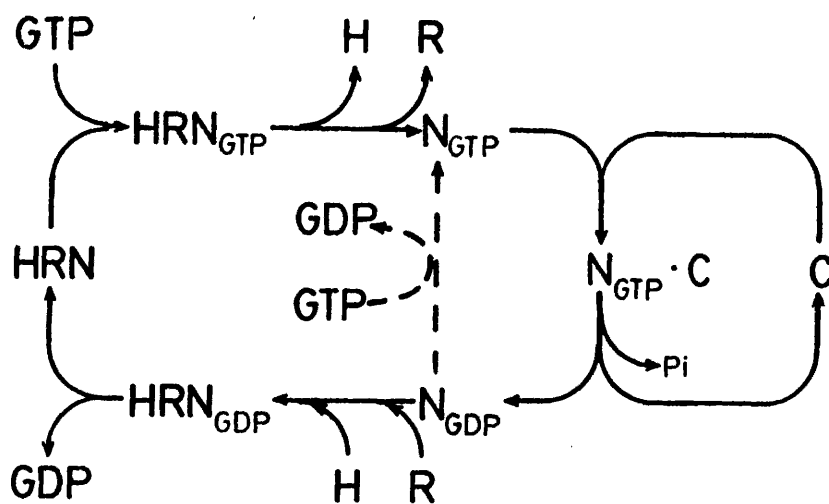


Figura 10. Esquema hipotético para la activación de la adenilato ciclasa por hormona y GTP propuesto por Bourne y colaboradores.  
N = Componente Regulador  
C = Componente Catalítico  
R = Receptor  
H = hormona

CAPITULO	I	PAGINA	50	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

formasen parte de este complejo ternario activo.

Este modelo es consistente con estudios cinéticos de la activación hormonal de la adenilato ciclasa, realizados en células del linfoma S49 (92) y en membranas de eritrocito de pavo (165).

El modelo de Bourne postula, por otro lado, que  $N_{GTP}$  se produce por reciclado de  $N_{GDP}$ , y sugiere que la hormona (H) actúa promoviendo el recambio del GDP por el GTP en el componente regulador (N).

En las células y ensayos enzimáticos de la actividad de la adenilato ciclasa, la concentración de GTP es superior a la de GDP, de tal forma que una vez liberado el GDP del complejo  $HRN_{GDP}$ , la posterior liberación de la hormona del complejo RN permitiría la unión del GTP al componente regulador, el receptor podría disociarse en este punto, y el ciclo de activación empezaría de nuevo. Otra posibilidad no descartada en el modelo, sería que la liberación de la hormona del complejo HRN se produzca en forma simultánea con la unión del GTP, o incluso que dicha liberación sea causada precisamente por la unión del nucleótido.

La hipótesis de Bourne sugiere que, la activación hormonal de la actividad GTPasa, asociada a la adenilato ciclasa, no sería un efecto directo de la hormona, sino que ésta favorecería la unión del GTP al sitio del componente regulador en el cual se produciría la hidrólisis del GTP, dentro del complejo  $N_{GTP}.C$ .

Existe una diferencia observada en eritrocito de pavo, con respecto a otros sistemas, como células del linfoma S49 o eritrocito de sapo, en el sentido de que análogos del GTP resistentes a la hidrólisis, tales como el  $Gpp(NH)P$  o el  $GTP-\gamma-S$ , estimulan rápidamente y a un nivel máximo, la adenilato ciclasa en estos últimos sistemas, pero la activación es muy lenta en membranas de eritrocito de pavo a menos que la hormona esté presente (120).

De acuerdo al modelo de Bourne y al de Ross y Gilman, los análogos del GTP pueden unirse a N sólo si el GDP es previamente liberado por mediación del complejo hormona-receptor. Una posible

CAPITULO	I	PAGINA	51	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

explicación de este hecho es considerar que el GDP pueda disociarse en forma espontánea del componente regulador, como se describe en la figura 10, por las líneas a trazos.

De esta forma, la diferencia observada entre los sistemas a los que antes se aludía, residirían en que los mismos poseen una distinta velocidad de disociación espontánea del GDP, alta en las células del linfoma S49, y baja para el sistema de membranas de eritrocito de pavo.

En términos del modelo de Ross y Gilman (fig. 7), en ausencia de hormona  $K_{-2}$  gobernaría el paso limitante en la regeneración de  $N_{GTP}$ , de tal forma que en eritrocito de pavo  $K_{-2}$  sería prácticamente nula, mientras que en los otros sistemas mencionados  $K_{-2}$  tendría un valor bajo pero finito.

A pesar del evidente soporte experimental que avala los modelos anteriormente expuestos, hay que considerar que éstos se basan en asociaciones existentes entre el componente regulador y el receptor, o el componente catalítico, los cuales han sido estudiados preferentemente en sistemas solubilizados con detergentes.

Los principales estudio del sistema adenilato ciclasa "in situ", en su forma asociada a membrana, se deben al grupo de Rodbell, el cual, recientemente mediante la técnica de "inactivación por irradiación" determinó el tamaño de la adenilato ciclasa en situaciones experimentales definidas (37)(40).

De esta forma, el mencionado grupo calculó para el sistema adenilato ciclasa sensible a hormona, un tamaño entre 6 y  $13 \times 10^5$  D., sin embargo, el tamaño se reducía después de la preactivación con  $F^-$ , nucleótidos de guanina o después de la activación en presencia de GTP y hormona (40). De estas observaciones, se dedujo que una forma de gran tamaño era un precursor esencial para la activación del sistema por varios efectores.

También se comprobó que el tamaño del receptor en su forma asociada al componente regulador (complejo RN) era aproximadamente de 700000 D., y que cuando la enzima era activada por glucagón y



CAPITULO I	PAGINA 52	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

GTP el tamaño disminuía a 350000 D., a pesar de que esta última - unidad funcional debería incluir además del complejo RN, el compo-  
nente catalítico.

El estudio de los diferentes tamaños del sistema adenilato cicla-  
sa "in situ", en condiciones determinadas, llevó a estos autores  
a suponer que el complejo RN está presente en la membrana como -  
una estructura oligomérica (154). El acoplamiento de RN con el -  
componente catalítico se realizaría, según el grupo de Rodbell, -  
por un mecanismo de despolimerización, inducido por la hormona y  
el GTP, tal como se esquematiza en la figura 11.

Este modelo, denominado "acoplamiento por disgregación", sugiere  
la existencia de una estructura oligomérica compuesta de unidades  
constituidas por el receptor (R) y el componente regulador (N), la  
cual existiría en dos configuraciones distintas, una estructura A  
(figura 11) no ocupada, que favorecería la unión de la hormona (H)  
pero no la unión de GTP, y una estructura B, inducida por la --  
unión de la hormona a la forma A, en la cual la asociación del  
GTP al componente regulador estaría favorecida. La reacción del  
GTP con la forma B, produciría la disgregación de la estructura -  
oligomérica, quedando libres los monómeros RN, los que al asociar  
se con el componente catalítico C, originarían la forma activada  
de la holoenzima.

Este modelo contempla varias diferencias significativas con res-  
pecto a los anteriormente expuestos. En primer lugar, supone que  
el complejo hormona-receptor formaría parte de la holoenzima acti-  
vada, y en segundo lugar, considera que el proceso de inactiva-  
ción no implicaría necesariamente la hidrólisis del GTP.

Hay que considerar que el modelo de "acoplamiento por disgrega-  
ción", supone una nueva visión del proceso de modulación hormonal  
pero la base experimental que lo sustenta es restringida y, por -  
lo tanto, su validez debe seguir siendo estudiada.

CAPITULO	I	PAGINA	53	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

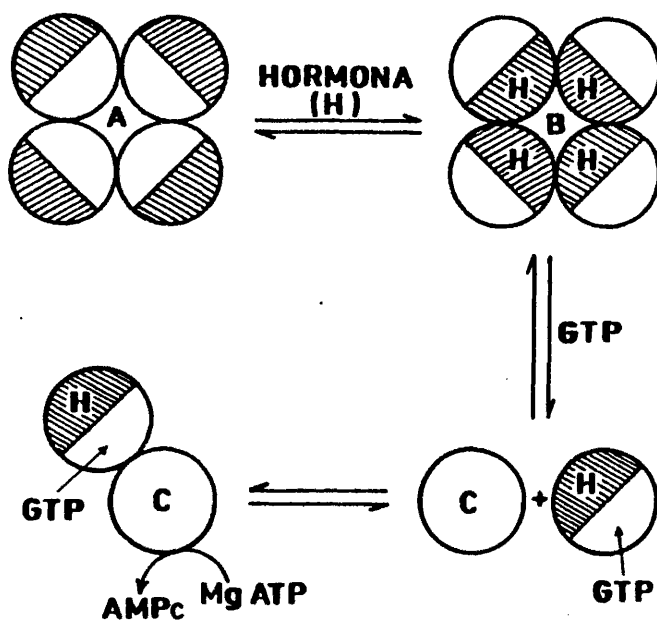



Figura 11. Modelo de acoplamiento por "disgregación", propuesto por Rodbell y colaboradores para explicar la activación del sistema adenilato ciclasas por hormonas y GTP.

Receptor (R) —   
 Componente  
 Regulador (N) —

CAPITULO	I	PAGINA	54	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

### XIII. PAPEL DEL cAMP EN LOS SERES VIVOS

El cAMP es un agente regulador ampliamente generalizado de todas las células y tejidos (10). Su función afecta procesos intracelulares tan variados como: secreción, diferenciación, replicación, transporte, locomoción, utilización de energía, etc (166).

El primer efecto biológico atribuido al cAMP, fué la activación - en el hígado de la fosforilasa de glucógeno, responsable de la de gradación de dicho polisacárido con formación de glucosa-1-fosfato. En el hígado y en el músculo, la fosforilasa existe bajo dos formas: una denominada fosforilasa a (activa) y otra denominada fosforilasa b (inactiva). La conversión de la forma b a la forma a, implica la fosforilación de la molécula de fosforilasa b, a - partir del ATP, por mediación de la quinasa de la fosforilasa.

Esta última enzima a su vez, existe en dos formas: una activa fosforilada y otra inactiva defosforilada. La conversión de la forma inactiva a la activa se produce por la acción de una quinasa - de proteína, cuya actividad se manifiesta en presencia de cAMP - (167).

Las quinasas de proteínas fueron descubiertas por el grupo de Edwing Krebs (168). Su acción catalítica radica en la transferencia del grupo fosfato terminal del ATP, a los residuos serina o - treonina de las cadenas polipeptídicas en presencia de  $Mg^{+2}$ .

La mayor parte de estas enzimas son moduladas por interacción directa con agentes reguladores que son, en muchos casos, mensajes - ros de señales provenientes del exterior de la célula.

En base a este criterio, se ha clasificado a las quinasas de proteínas en: dependientes de cAMP (168), dependientes de cGMP (169) dependientes de  $Ca^{+2}$  (170), y dependientes de RNA bicatenario - (171).

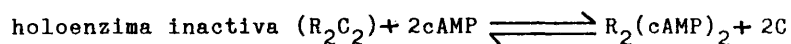
Las quinasas de proteínas dependientes de cAMP fueron las primeras en ser caracterizadas (168) y pueden ser considerados como - los verdaderos receptores intracelulares de dicho nucleótido. Me

CAPITULO	I	PAGINA	55	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

diante la acción de estas enzimas, el cAMP puede regular procesos de fosforilación de proteínas específicas, lo que supone una modulación de los procesos fisiológicos en los que dichas proteínas intervienen.

#### XIII,1 QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE cAMP

Existen, al menos dos tipos diferentes de quinasas de proteínas dependientes de cAMP, denominadas I y II. Ambas isoenzimas son proteínas tetraméricas cuya actividad catalítica es estimulada por el cAMP. Este nucleótido provoca la disociación de la holoenzima inactiva en una subunidad regulatoria dimérica ( $R_2$ ) que une cAMP y dos subunidades catalíticas activas (C) (172):



Las subunidades catalíticas de ambos tipos de quinasas tienen pesos moleculares, composición de aminoácidos y especificidades de sustrato muy similares. Esto indicaría que poseen una subunidad catalítica común, cuyo peso molecular es de 40000 D. Las subunidades regulatorias, en cambio, difieren en sus pesos moleculares, siendo de 49000 D. para el tipo I y de 56000 D. para el tipo II (173).

Las principales diferencias entre ambos tipos de quinasas de proteínas dependientes de cAMP, se refieren a su localización celular y al comportamiento de la subunidad regulatoria frente al ATP.

Corbin y colaboradores (174) demostraron que la quinasa tipo I es tá localizada en el citoplasma, mientras que la del tipo II se en cuenta asociada a membrana.

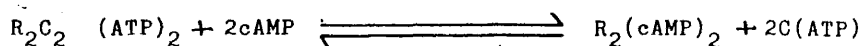
Esta asociación se realiza mediante las subunidades regulatorias,

CAPITULO I	PAGINA 56	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

de manera que al interaccionar la quinasa con cAMP, se liberarían el citoplasma subunidades catalíticas activas, en tanto que el - complejo subunidad regulatoria cAMP, permanecería asociado a la - membrana (figura 12). Por otra parte, la enzima de tipo II, tiene la capacidad de autofosforilar sus subunidades regulatorias en presencia de ATP, lo que origina un incremento de la sensibilidad de la enzima al cAMP (175). Esta modificación hace que la concentración de cAMP necesaria para la disociación de ambos componentes, sea menor, y al mismo tiempo, disminuye la velocidad de reasociación en ausencia del nucleótido cíclico (176).

La quinasa de proteína tipo I, si bien no es modulada por autofosforilación, se regula por un mecanismo que involucra también al - ATP (figura 13). La enzima no disocia una o dos moléculas de ATP con alta afinidad, esto origina una disminución en la capacidad - de unión de cAMP, siendo entonces necesaria una mayor concentración de este nucleótido para la disociación y subsecuente activación de la enzima. El ATP provoca, además, un aumento de la velocidad de reasociación en ausencia de cAMP. Al encontrarse el - ATP en la célula en concentración bastante elevada, este proceso supone un mayor requerimiento de cAMP para la activación de este tipo de quinasa (177), este requerimiento de cAMP estaría dentro de los niveles intracelulares alcanzados luego de la respuesta - hormonal de la adenilato ciclasa.

La ecuación de activación de la quinasa de proteínas tipo I sería



La existencia simultánea de estos dos tipos de quinasas de proteínas dependientes de cAMP, implicaría para las mismas, diferentes papeles fisiológicos, de acuerdo a sus distintas subunidades regulatorias. La quinasa tipo II, sería más sensible a un aumento de cAMP, que la de tipo I, éstas últimas se reasocian más rápidamente al bajar los niveles del nucleótido cíclico.

Se ha demostrado, por otro lado, la existencia de determinados in

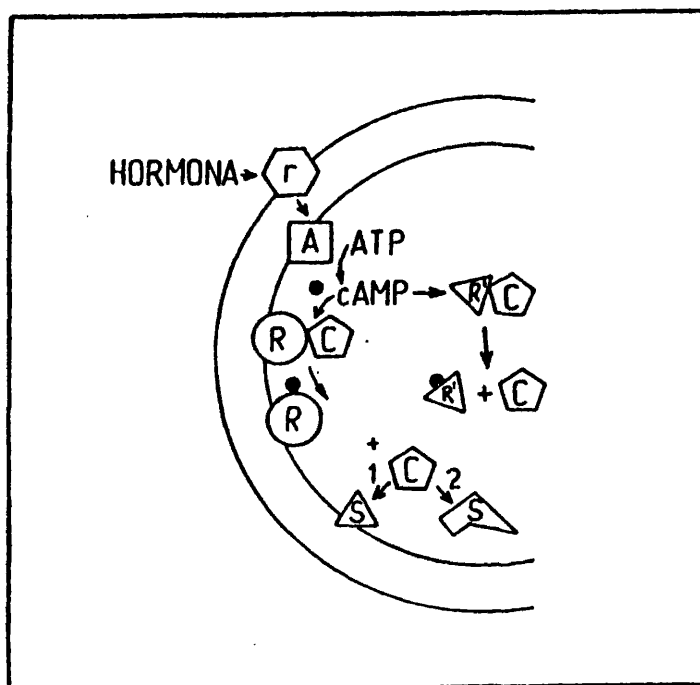


Figura 12. Modelo propuesto por Corbin para el mecanismo de acción hormonal. Este modelo, en el que se amplía el modelo de Sutherland (Fig.3), propone la compartimentalización de las quinasas de proteínas. La subunidad reguladora (R) de la quinasa de tipo II, estará unida a la cara interna de la membrana plasmática, mientras que la de tipo I (R'), estará libre en el citoplasma. De este modo, la subunidad catalítica (C) (que es común a ambas) podría actuar de modo más eficiente sobre sus sustratos proteicos (S) localizados en la membrana, como primera respuesta a la acción hormonal..

CAPITULO	I	PAGINA	58	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

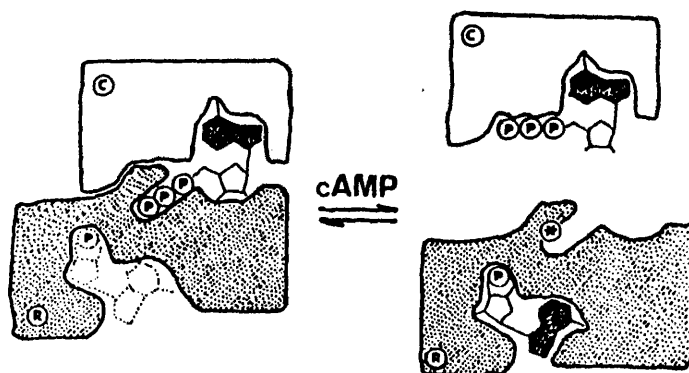


Figura 13. Mecanismo propuesto para la activación de la quinasa de proteínas de tipo I. En la célula viva altos niveles de AMP cíclico causan la disociación y activación de la enzima: el nucleótido cíclico se une con alta afinidad al sitio  $R_{(I)}$  y la subunidad C transfiere el fosfato del ATP a sus proteínas sustrato. La reducción de los niveles de AMP cíclico lleva a la formación de las moléculas asociadas de enzima ( $R_{(I)}_2C$ ). A través de esta asociación el sitio para el sustrato ATP de C, se convierte en un sitio de alta afinidad para el nucleósido trifosfato, para lo cual contribuye también R. Esta transformación del sitio del ATP causa la inhibición de la actividad fosfotransferasa. Por otra parte, el sitio de alta afinidad para AMP cíclico en la subunidad  $R_{(I)}$  libre queda transformado en un sitio de baja afinidad por causa de la reasociación. Si la enzima es de tipo II, el asterisco, marca el sitio de posible fosforilación. La incorporación de fosfato en dicho sitio de  $R_{(II)}$  induce la disociación de la quinasa y podría inhibir la unión de alta afinidad del ATP, a la holoenzima  $R_{(II)}_2C$ .

CAPITULO I	PAGINA	59	INTRODUCCION
------------	--------	----	--------------

inhibidores protéicos termoestables de estas quinasas. El inhibidor más estudiado fué el de músculo de conejo, cuyo peso molecular es de 11300 D. Dicho inhibidor, actúa asociándose a la subunidad catalítica de la quinasa, como un inhibidor competitivo de los sustratos protéicos.

La concentración de inhibidor en el tejido, permite bloquear el 20 % de la actividad quinasa, dependiente de cAMP (178). Este hecho permitiría suponer un papel regulador para este factor, cuando la concentración intracelular de cAMP se encuentra en niveles cercanos a los basales, pero no cuando se encuentra incrementada (179). Las cantidades de inhibidor en la célula pueden variar si se la somete a distintas condiciones fisiológicas, lo que reforzaría la idea de su posible papel regulador de la actividad quinasa (180).

Las concentraciones intracelulares de cAMP son del orden de  $10^{-6}M$  suponiendo una distribución uniforme del nucleótido en el medio acuoso de la célula, sin embargo, la concentración de cAMP, requerida para lograr el 50 % de la máxima actividad catalítica de la quinasa purificada, es aproximadamente  $10^{-8}M$ . En estas condiciones, el nivel basal de cAMP sería más que suficiente para mantener a las quinasas en un estado completamente activado, no obstante, la actividad basal de las quinasas de proteínas "in vivo", es baja, y hay una buena correlación entre los aumentos intracelulares del nucleótido y el incremento de la actividad catalítica.

Una posible explicación para esta paradoja es que, el cAMP y la quinasa de proteínas se encuentran separados, en compartimentos celulares diferentes. Steiner y su grupo (181) demostraron con la ayuda de la inmunofluorescencia, una distribución discreta del cAMP y del cGMP en células de la glándula tiroides. Recientemente, Brunton y colaboradores, obtuvieron resultados que sugieren una compartimentalización del cAMP y la quinasa de proteína, para explicar la regulación por cAMP de la contracción cardíaca (182).

Existen otros factores que pueden modificar la interacción de la quinasa con el cAMP. Uno de ellos es el efecto ya mencionado del



CAPITULO I	PAGINA 60	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

ATP sobre la reasociación de las subunidades separadas de la quinasa tipo I, aumentando el grado de disociación entre el cAMP y la enzima. La constante de disociación para el complejo subunidad regulatoria cAMP, es de  $6 \cdot 10^{-9} \text{M}$ , en ausencia de ATP, mientras que, en presencia de una concentración fisiológica de este nucleótido (4mM), dicha constante se ve incrementada a  $2 \times 10^{-7} \text{M}$ , valor cercano al de los niveles intracelulares alcanzados por el nucleótido cíclico, luego de la estimulación hormonal.

Otro factor que provoca una variación de la constante de disociación entre el cAMP y la quinasa, es el número de moléculas de esta enzima por célula. Por ejemplo, en presencia de ATP y caseína cuando la quinasa se encuentra a una concentración de  $10^{-8} \text{M}$ , la constante de disociación para el cAMP, es de  $2 \times 10^{-7} \text{M}$ , en cambio, cuando la concentración de la enzima se eleva a  $2 \times 10^{-7} \text{M}$ , la constante de disociación se incrementa a  $1,5 \times 10^{-6} \text{M}$ . Este mecanismo podría operar "in vivo", ya que la concentración de quinasa de proteína en la célula, es del orden de  $2-3 \times 10^{-7} \text{M}$ , casi idéntica a la de su activador.

De esta forma, tanto el sustrato de las quinasas de proteínas, como la concentración de enzima y la existencia de inhibidores protéticos termoestables, condicionan las relaciones entre el cAMP y las subunidades regulatorias de la quinasa, asegurando una correlación entre el rango dentro del cual varían los niveles intracelulares del cAMP y la sensibilidad de las quinasas de proteínas a dicho nucleótido.

### XIII,2 FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS

Si la fosforilación de las cadenas polipeptídicas, efectuadas por las quinasas de proteínas, fuera un proceso irreversible, los --

CAPITULO	I	PAGINA	61	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

efectos hormonales serían permanentes, aun cuando desapareciera - la causa que provoca el aumento de los niveles intracelulares de cAMP. La reversibilidad del proceso viene dada por la defosforilación de las proteínas fosforiladas.

Esta reacción, es catalizada por un grupo especial de fosfohidrolasas denominadas fosfatasa de fosfoproteínas (fosfoproteína fosfohidrolasa, E.C. 3.1.1.16).

La actividad fosfatasa que cataliza la defosforilación de una variedad de sustratos protéicos en forma inespecífica, se purificó a homogeneidad, a partir de preparaciones de hígado y corazón -- (183) y se asoció con una proteína de peso molecular 35000 D., que representaría la porción catalítica de una holoenzima constituida por dos subunidades catalíticas y una subunidad de peso molecular 65000 D., con posible función inhibidora (184).

La regulación de las fosfatasas de fosfoproteínas, puede presentarse bajo diferentes formas:

- a) competencia de varios sustratos por la enzima
- b) unión específica de modificadores con los sustratos protéicos
- c) interacción no competitiva de moduladores protéicos con la enzima

En este último tipo de regulación, puede ser encuadrada la actuación de los inhibidores protéicos termoestables del músculo, denominados inhibidores 1 y 2, y del inhibidor de hígado (185).

El inhibidor 1 para ser activo debe ser fosforilado por una quinaasa de proteína dependiente de cAMP (186)(figura 14).

Así pues, el aumento en los niveles de cAMP, determina, por un lado, la activación de las quinasas de proteínas dependientes de dicho nucleótido, y por otro, la inactivación de las fosfatasas de fosfoproteína, por el inhibidor 1, lo que supone, en definitiva, un balance favorable es el sentido de la fosforilación protéica.

CAPITULO	I	PAGINA	62	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

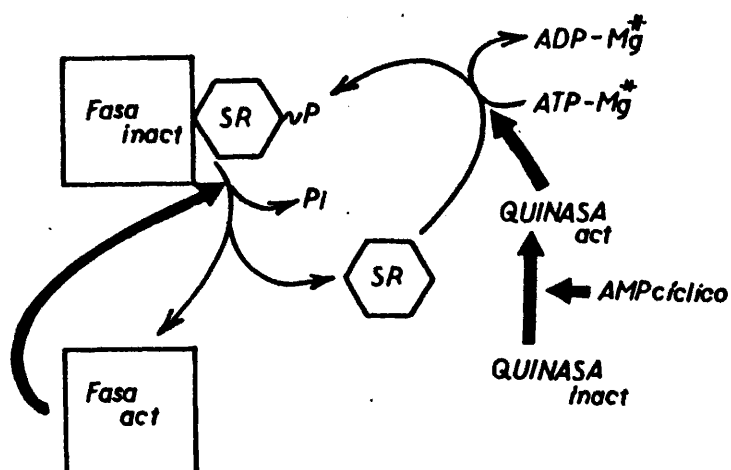


Figura 14. Circuito de regulación de las fosfatasas de fosfoproteínas. La fosfatasa activa se une al inhibidor de tipo I ( $i_1$ ) que para actuar - debe ser fosforilado por una quinasa de proteínas, - dependiente de AMP cíclico.

CAPITULO	I	PAGINA	63	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

### XIII,3 PROCESOS DE FOSFORILACION-DEFOSFORILACION MEDIADOS POR - cAMP

La fosforilación de proteínas, es el principal mecanismo por el -  
cual los procesos intracelulares, responden a los estímulos fisio-  
lógicos externos, ya sean mediados por el cAMP o por otros agen-  
tes.

El cAMP, a través de la modulación simultánea de las quinasas y -  
fosfatasas de fosfoproteínas, regula una gran variedad de proce-  
sos fisiológicos.

En la glucogenolisis (187), desempeña su papel regulador modulan-  
do los estados de fosforilación de la fosforilasa del glucógeno,  
la quinasa de la fosforilasa y la glucógeno sintetasa, así como -  
controlando la expresión de la actividad de las fosfatasas. La -  
acción glucogenolítica del cAMP se esquematiza en la figura 15.  
Esta se produce por la acción de las quinasas de proteínas depen-  
dientes de cAMP, las cuales originan:

- a) un incremento de los niveles de la quinasa de la fosforilasa  
y subsecuentemente, de la fosforilasa del glucógeno a
- b) una reducción de los niveles de glucógeno sintetasa activa y
- c) una inhibición de la actividad de la fosfatasa de proteínas  
a través de la activación del inhibidor 1.

El papel activador de las quinasas de proteínas dependientes de -  
cAMP, observado inicialmente en cuanto a su acción sobre la quina-  
sa de la fosforilasa, pronto hizo suponer que estas enzimas opera-  
ban en forma más generalizada mediando los diversos efectos ejer-  
cidos por el cAMP en las células, de tal manera que la especifici-  
dad de una hormona determinada, estaría condicionada por la pre-  
sencia del receptor correspondiente en la membrana plasmática de  
la célula, y además, por la presencia de determinados sustratos -  
fisiológicos de las quinasas de proteínas, dependientes de cAMP -

CAPITULO	I	PAGINA	64	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

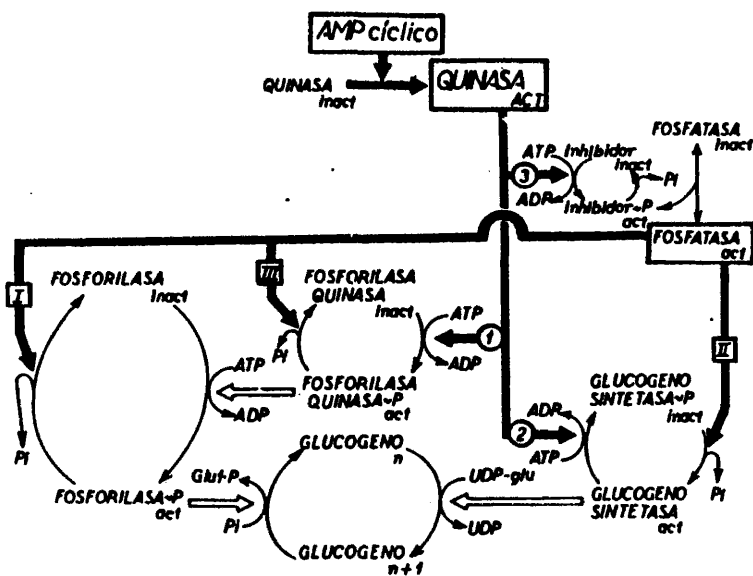


Figura 15. Control del metabolismo del glucógeno por AMP cíclico.

CAPITULO I	PAGINA 65	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

en su interior.

En el caso de que los sustratos sean enzimas, el efecto de la fosforilación, generalmente, supone una modificación: de la  $K_m$  para el sustrato, de la  $K_a$  para un activador, o de la  $K_i$  para un inhibidor. Por otra parte, los propios sustratos o determinados activadores e inhibidores, pueden también afectar la velocidad de fosforilación o defosforilación de las enzimas sobre las que actúan.

Así pues, los procesos de fosforilación-defosforilación enzimática no suponen, en general, un mecanismo por el cual la enzima actúa o deja de actuar, sino que más bien, originan dos o más estados de la enzima que responden de distinta manera a sustratos y moléculas reguladoras. Los efectos producidos en la enzima por: la fosforilación covalente, las moléculas efectoras alostéricas y los propios sustratos, representan la forma por la cual, la información extra e intracelular se integra para determinar la actividad precisa de una ruta metabólica "in vivo" (188).

La presencia, en diferentes tejidos de una variedad de sustratos para las quinasas de proteínas dependientes de cAMP, explica la diversidad de la acción hormonal, mediada por este nucleótido.

En el tejido adiposo, la triglicérido lipasa (triacyl glycerol acil hidrolasa E.C. 3.1.1.3.), existe en dos formas, una activa fosforilada y otra inactiva defosforilada (189). La fosforilación es catalizada por una quinasa de proteína dependiente de cAMP, de tal forma que la acción lipolítica del cAMP en este tejido se verifica por un mecanismo muy similar al ejercido sobre el metabolismo del glucógeno.

Recientes trabajos del grupo de Severo Ochoa (190), asignan al cAMP un papel regulador en la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos.

En este sistema, el cAMP, activaría una quinasa capaz de fosforilar un inhibidor de la acción del factor de iniciación de la traducción eIF-2.

En el Sistema Nervioso, existen suficientes evidencias para consi

CAPITULO I	PAGINA 66	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

derar que el cAMP, a través de la acción de las quinasas de proteínas, desempeña, en primer lugar, un importante papel en la regulación de la biosíntesis de determinados neurotransmisores, modulando la actividad de la tirosina hidroxilasa, y en segundo lugar, mediando los efectos postsinápticos de los neurotransmisores en cierto tipo de sinapsis, mediante la regulación del estado de fosforilación de proteínas específicas de membrana implicadas en el transporte iónico, a través de la misma (191).

La importancia de las quinasas de proteínas dependientes de cAMP, se ha establecido en otros casos, por ejemplo: la fosforilación de la troponina I, en las fibras de músculo cardíaco disminuye su afinidad por el  $\text{Ca}^{+2}$ .

Esta observación, puede contribuir a explicar el incremento de la velocidad de relajación del músculo cardíaco, producido por la adrenalina (192). Por otra parte, el crecimiento de células de mamífero es inhibido por cAMP después de ser añadido al medio de cultivo, este hecho permite la selección de mutantes en los cuales este fenómeno no se observa. Las mutantes seleccionadas tienen su actividad quinasa de proteína dependiente de cAMP sensiblemente reducida (193).

Una de las características de las quinasas de proteínas dependientes de cAMP, es su alta especificidad, fosforilando muy pocas proteínas a velocidad significativa. La base de esta especificidad se ha puesto de manifiesto recientemente con el descubrimiento de que los sustratos fisiológicos de estas enzimas contienen invariablemente dos aminoácidos básicos adyacentes al residuo que es fosforilado (194).

Existen otros efectos ejercidos por el cAMP en los cuales aún no se ha confirmado un papel directo de las quinasas de proteínas, como en la secreción, diferenciación, etc., pero, en parte, hay que considerar que la naturaleza molecular de estos procesos en sí, es aún desconocida.

CAPITULO I	PAGINA 67	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

#### XIII,4 $\text{Ca}^{+2}$ Y cAMP

La información existente sobre las interacciones del  $\text{Ca}^{+2}$  y el cAMP en los procesos celulares, es muy limitada ya que las investigaciones se han focalizado principalmente en la actuación de cada uno de estos agentes por separado.

El estudio de dichas interacciones entre  $\text{Ca}^{+2}$  y el cAMP en diferentes tejidos, ha permitido diferenciar dos mecanismos de control: Sistemas de control monodireccional y Sistemas de control bidireccional (195).

Las características básicas del control monodireccional son:

1. Los agentes estimuladores pueden incrementar, parcialmente, los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  y cAMP.
2. El cAMP incrementa el  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico y las acciones llevadas a cabo por este catión.
3. El  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico no modula los niveles de cAMP.

Tanto el  $\text{Ca}^{+2}$  como el cAMP pueden inducir respuestas diferentes en la célula.

La liberación de catecolaminas en la médula adrenal o el control de la esteroidogénesis en la corteza adrenal, se ajustan a este tipo de control monodireccional.

El esquema de control bidireccional, se ajusta a células reguladas por dos agentes estimuladores opuestos. La presencia de un estimulante, origina un incremento en la actividad celular, mientras que el segundo estimulante origina la recuperación del efecto causado por el anterior o la acción opuesta.

En la mayoría de los casos el  $\text{Ca}^{+2}$  es el segundo mensajero para el primer estimulante, mientras que la acción antagónica del segundo estimulante, es aparentemente mediada por el cAMP que actúa disminuyendo los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático. En los casos en que el cAMP actúa como segundo mensajero primario, tal como ocurre en hígado o en tejido adiposo, la existencia de un segundo



CAPITULO	I	PAGINA " 68	INTRODUCCION
----------	---	-------------	--------------

mensajero mediando la acción del estimulante opositor como sería la insulina, no se ha podido establecer.

Las características básicas del control bidireccional son:

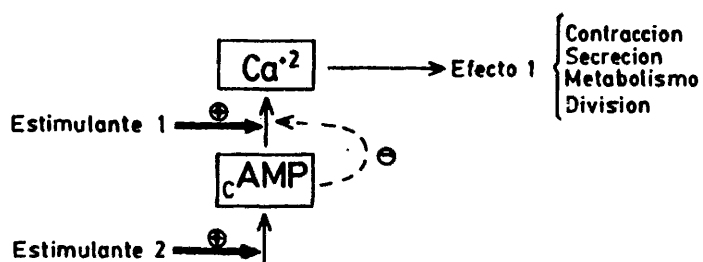
1. Un grupo de estimulantes incrementa el cAMP y otro grupo diferente aumenta el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular.
2. El cAMP disminuye el  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático.
3. El efecto del  $\text{Ca}^{+2}$  es opuesto al del cAMP.

La contracción del músculo liso o el metabolismo del glucógeno - en el hígado, son procesos que se ajustan a este mecanismo de - control bidireccional.

La diferencia básica entre los sistemas de control mono y bidi - direccional reside en la naturaleza de la interacción entre el - cAMP y el  $\text{Ca}^{+2}$  (figura 13). En el sistema monodireccional, el - cAMP potencia la señal del  $\text{Ca}^{+2}$ , mientras que en el bidireccio - nal, se opone a ella.

CAPITULO	I	PAGINA	69	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

### SISTEMA BIDIRECCIONAL



### SISTEMA MONODIRECCIONAL

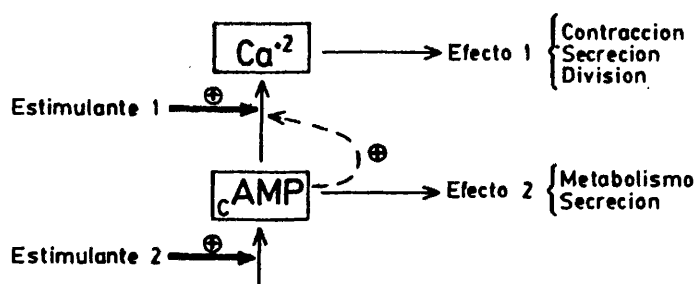


Figura 13. Representación esquemática de los sistemas de control mono y bidireccional ejercidos por el  $Ca^{+2}$  y el cAMP.

CAPITULO	I	PAGINA	70	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

#### XIV. cAMP Y ADENILATO CICLASA EN BACTERIAS

##### XIV.1. cAMP EN ESCHERIGHIA COLI

Un hecho conocido hace muchos años es que la capacidad de E.coli de fermentar la lactosa se inhibe cuando la glucosa se encuentra también en el medio de cultivo (196).

La glucosa origina la inhibición de la síntesis, no sólo de las enzimas que intervienen en el catabolismo de la lactosa, sino también de otras enzimas inducibles. Esta capacidad de la glucosa de inhibir la síntesis de una variedad de enzimas, se denominó "efecto glucosa".

Poco tiempo después del descubrimiento del cAMP por Sutherland y colaboradores en células animales, estos mismos autores demostraron la presencia de este nucleótido en E. coli y observaron que su nivel era afectado por el sustrato que soportaba el crecimiento de la bacteria (197).

Cuando la bacteria crece en un medio suplementado con glucosa, los niveles de cAMP están sensiblemente disminuidos, sin embargo al agotarse la glucosa en el medio, los niveles de cAMP aumentan considerablemente. La readición de glucosa vuelve a hacer descender los niveles del nucleótido.

De estas observaciones surgió la idea de que la glucosa podría reprimir la síntesis de la  $\beta$ galactosidasa y otras enzimas catabólicas inducibles a través de una disminución en los niveles de cAMP.

Perlman y Pastan (198) demostraron que al añadir cAMP a los cultivos de E.coli se contrarrestaban los efectos represivos de la glucosa sobre la síntesis de la  $\beta$ galactosidasa y la triptofanasa. Posteriormente, se demostró que el cAMP controla la síntesis de otras proteínas (199).

Concretamente, para el caso del operón lac, pronto se demostró -

CAPITULO	I	PAGINA	71	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

que el cAMP no solamente estimulaba la síntesis de la  $\beta$  galactosidasa en un extracto libre de células, sino que estimulada la síntesis del RNA mensajero correspondiente a dicho operón (200).

La existencia de una mutante incapaz de sintetizar las enzimas - sujetas al control de la glucosa, aun en presencia de cAMP, sugirió que el nucleótido requería de otra molécula intracelular para activar la expresión genética (201).

Zubay y colaboradores (202), demostraron que extractos de esta - mutante, denominada crp, no podían sintetizar  $\beta$  galactosidasa aun en presencia de cAMP, pero cuando dichos extractos, se suplementaban con los de células normales, el defecto se corregía. Este grupo demostró que el factor ausente en crp era de naturaleza - protéica. Posteriormente, Emmer y colaboradores (203), usando - [ $^3\text{H}$ ]cAMP, observaron que dicha proteína era capaz de unir el nucleótido cíclico y se denominó CRP (Proteína Receptora de cAMP).

Esta proteína tiene un peso molecular de 45000 D., y está constituida por dos subunidades idénticas.

El cAMP forma un complejo con la CRP que actúa a nivel de la iniciación de la transcripción. El modelo simplificado propuesto, según los diferentes estudios realizados con el operón lac, se - esquematiza en la figura 14.

El complejo cAMP-CRP reconoce una secuencia característica del - promotor, a través de la cual se asocia al DNA.

La región del promotor a la que se une la RNA polimerasa está - constituida por una zona rica en adenina y timina (A-T), la cual está flanqueada por zonas ricas en guanina y citosina (G-C). La zona A-T, debido a su inherente baja temperatura de transición, es por donde la RNA polimerasa "entra" al DNA, pero esta zona es - tá asociada a ambos lados a regiones G-C que tienen un fuerte - efecto estabilizante de la zona A-T, elevando su temperatura de transición e inhibiendo de esta forma la asociación de la RNA polimerasa al DNA.

Dickson y colaboradores (204), sugieren que la unión del comple-

CAPITULO	I	PAGINA	72	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

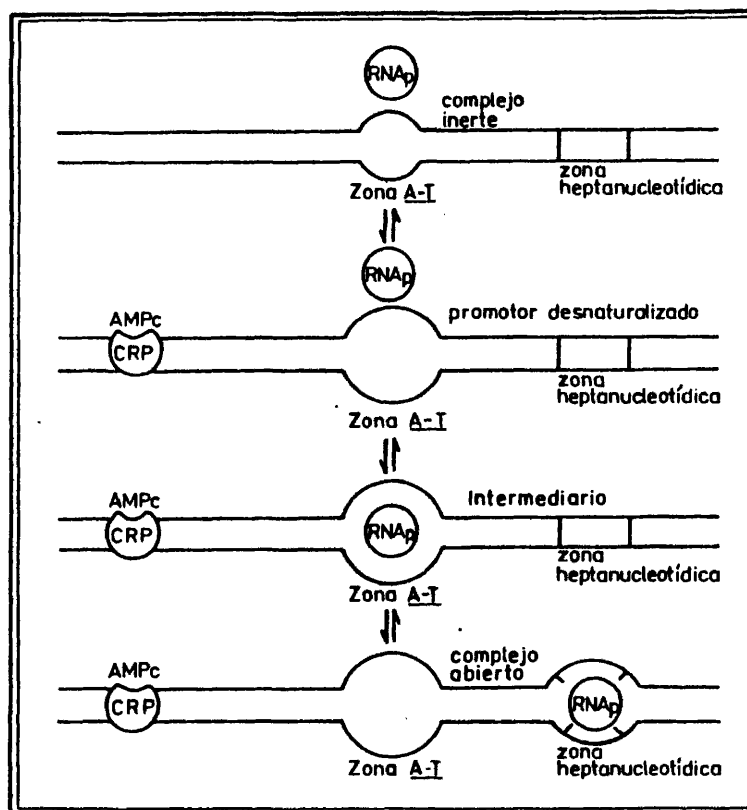


Figura 14. Modelo para la iniciación de la transcripción del operón *lac*. La RNA polimerasa (RNAP) forma un complejo inerte de iniciación en la zona rica en adenina y timina (zona A-T). El complejo cAMP-CRP interacciona en un sitio específico del operón, originando la disociación de la zona A-T y favoreciendo la "entrada" de la RNAP al DNA. El equilibrio existente entre estos dos estados de la RNAP es influenciado por la afinidad de ésta hacia la zona heptanucleotídica cercana al punto de inicio de la transcripción.

CAPITULO	I	PAGINA	73	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

jo cAMP-CRP al DNA desestabiliza las regiones G-C adyacentes a la zona de interacción de la RNA polimerasa, favoreciendo la asociación de ésta al promotor y, por consiguiente, a la iniciación de la transcripción.

Algunos promotores, a través de los que actúa la RNA polimerasa de E. coli, han sido secuenciados y se ha encontrado en todos ellos la presencia de una misma zona constituida por siete nucleótidos. Esta zona se encuentra pocos nucleótidos antes del lugar de inicio de la transcripción. Se ha sugerido que esta zona influencia el equilibrio de asociación de la RNA polimerasa al promotor.

#### XIV,2 LA ADENILATO CICLASA DE ESCHERIGHIA COLI

Los datos obtenidos con E. coli, creciendo en un medio suplementado con glucosa, han llegado a sugerir que la disminución de los niveles de cAMP se deben, no a una estimulación de la liberación del nucleótido al medio, sino más bien, a la inhibición de su síntesis (204).

La presencia de la adenilato ciclasa en E. coli fué documentada en 1969 por diversos laboratorios (205)(206).

Una gran proporción de la actividad adenilato ciclasa se asoció con la fracción de membranas pero, a diferencia de la enzima de células animales, la adenilato ciclasa de E. coli se puede extraer en forma soluble sin el uso de detergentes.

La enzima tiene un peso molecular aproximado de 110000 D., y funciona tanto con  $Mg^{+2}$  como con  $Mn^{+2}$ , siendo éste último preferido a bajas concentraciones del catión.

A pesar de que, aparentemente la glucosa inhibe la síntesis de cAMP "in vivo", no se ha podido demostrar un efecto inhibitorio

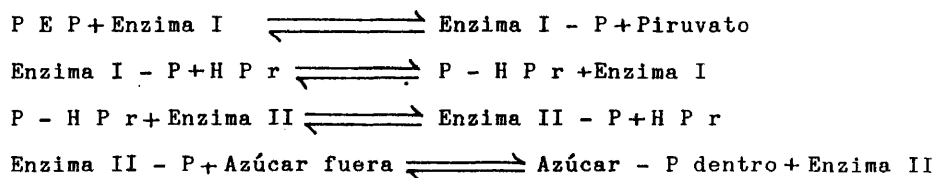
CAPITULO	I	PAGINA	74	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

de la glucosa sobre la actividad adenilato ciclasa en extractos libres de células. En este sistema se ha observado, por otra parte, el efecto inhibitorio que ejercen el oxalacetato y piridoxal fosfato sobre la enzima (205).

Peterkofsky (207) ha sugerido que un posible control de la actividad de la adenilato ciclasa se podría verificar a través de los sistemas de transporte de azúcares al interior de la bacteria.

Una gran proporción de azúcares que penetran en la bacteria implican a un sistema de transporte específico que usa la energía derivada del fosfoenolpiruvato (PEP), para acoplar la translocación del azúcar a través de la membrana mediante la fosforilación del mismo.

En dicho sistema de transporte intervienen tres enzimas, dos de ellas son citoplasmáticas y se denominan: Enzima I y HPr; la otra está asociada a la membrana y se denomina Enzima II, siendo esta última específica para cada azúcar que es transportado. La secuencia de acontecimientos que involucra a este sistema fosfo-transferasa sería:



En base a sus resultados Peterkofsky, sugiere que la Enzima en su forma fosforilada es un activador de la adenilato ciclasa, de tal forma que la desaparición del estado fosforilado, promovido por el transporte de la glucosa origina la inhibición o desactivación de la enzima y la consiguiente reducción de los niveles de cAMP.

No todos los azúcares transportados al interior de E. coli dependen de este sistema fosfotransferasa, de hecho muchos carbohidra

CAPITULO I	PAGINA 75	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

tos, tales como la lactosa, ribosa y glucosa-6-fosfato, cruzan - la membrana en forma inalterada, a través de un proceso que involucra el transporte de protones.

Como resultado de la utilización de la energía, las células originan un gradiente de protones a través de la membrana. En el - paso final de la generación de dicho gradiente interviene la bomba de protones, asociada a la membrana.

La entrada del azúcar al interior de la bacteria está asociada - al reciclado de protones, según el siguiente esquema:

$H^+$  dentro  $\xrightarrow[\text{asociada a membrana}]{\text{bomba de protones}}$   $H^+$  fuera

Azúcar fuera +  $H^+$  fuera  $\xrightarrow[\text{asociada a membrana}]{\text{Azúcar permeasa espq.}}$  Azúcar dentro +  $H^+$  dentro

Mediante el uso de un sustrato no metabolizable de la lactosa - permeasa como el tiometilgalactósido, se observó que este proceso de transporte origina la inhibición de la actividad adenilato ciclasa (208), y se demostró que dicha inhibición era consecuencia de la desaparición del gradiente de protones que acompaña al transporte del azúcar.

Un posible modelo de la regulación de la adenilato ciclasa acoplada a los procesos de transporte de azúcares se esquematiza en la figura 15.

Dicho modelo sugiere que el transporte de los azúcares al interior de la bacteria lleva consigo la inhibición de la adenilato ciclasa, la cual podría ser activada por diversos efectores en - el interior de la célula.

Así pues, la adenilato ciclasa de E. coli y algunas otras bacterias gram negativas, tienen una función trascendental en las - transiciones metabólicas de la bacteria y, careciendo de un contacto directo con el medio extracelular es capaz de actuar de - acuerdo con los requerimientos nutricionales del medio.



CAPITULO I	PAGINA 76	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

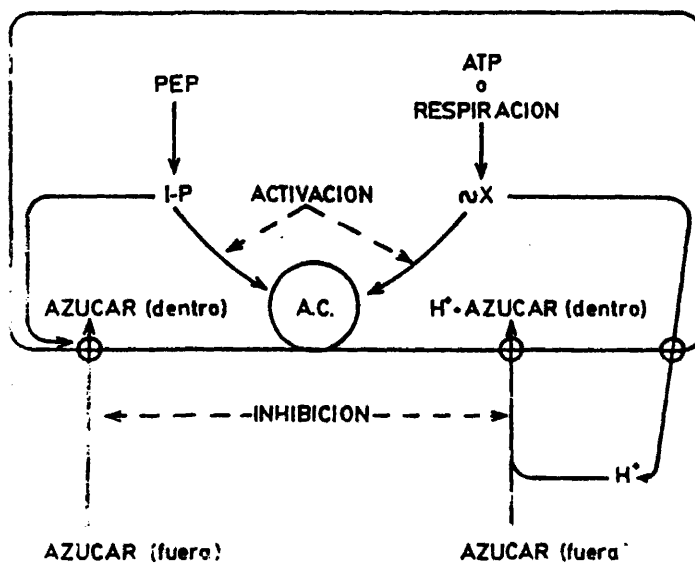


Figura 15. Modelo para la regulación de la adenilato ciclasa de *E. coli*.  
 La enzima en su forma fosforilada está asociada con la activación de la adenilato ciclasa (AC). Otro posible factor de activación es el aumento del gradiente electroquímico de  $H^+$  a través de la membrana también activando a la AC. La AC está en un estado energéticamente activo a través del sistema fosfotransferasa. El aumento de la actividad de la Enzima I originando el desequilibrio en la actividad de la adenilato ciclasa. El aumento de la actividad de la AC es el resultado del flujo de  $pp_i$  a través de la membrana.

CAPITULO I	PAGINA 77	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

#### XIV.3. ADENILATO CICLASA EN BACTERIAS

La existencia de la adenilato ciclasa en bacterias fué primera - mente puesta de manifiesto en Brevibacterium liquefaciens, en - 1967 (209). Esta enzima fué posteriormente purificada, y se de - terminó para la misma un peso molecular de 175000 D., por filtra - ción en gel (210). Se ha demostrado que el piruvato actúa como un efector alostérico positivo de la enzima. Este efecto acti - vador se ha puesto de manifiesto también con la adenilato cicla - sa de otras bacterias, tales como Micrococcus lysodeikticus, Arthrobacter globiformis, Arthrobacter citreus, Micrococcus flavus - (211). Sin embargo, las adenilato ciclasas de Escherichia coli, Nocardia erythropolis, Corinebacterium equi y Bordetella pertus - sis, entre otras, son insensibles al piruvato. Este hecho ha - llevado a clasificar a las adenilato ciclasas de bacterias en de - pendientes e independientes de piruvato (211). Sin embargo, las repercusiones fisiológicas de esta diferencia se desconoce.

#### XV. ADENILATO CICLASA Y cAMP EN PROTISTAS

El cAMP ha sido estudiado como un regulador intracelular en una gran variedad de organismos, sin embargo, estos estudios se han hecho preferentemente en animales superiores y E. coli.

En estos dos sistemas, se ha obtenido una diferente perspectiva del papel desempeñado por el cAMP.

En células animales, el cAMP, controla una gran variedad de fun - ciones que, aparentemente, no están relacionadas entre sí. En - E. coli, por otra parte, la función del cAMP parece exclusivamen - te dirigida a la activación de las funciones reprimidas por la - glucosa.

CAPITULO	I	PAGINA	78	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

Los estudios del cAMP y la adenilato ciclasa en protistas han -  
 permitido ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de regula-  
 ción ejercidos por este nucleótido, y también, comprender mejor  
 el comportamiento y las características moleculares de la enzima  
 responsable de sus síntesis.

De entre estos organismos y, en relación con estos estudios, los  
 que han recibido una atención especial, se detallan a continua -  
 ción:

#### XV.1. DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

Este mixomicete, miembro de las Acrasiales, es uno de los orga -  
 nismos más estudiados en cuanto al papel del cAMP en la diferen -  
 ciación.

Cuando las amebas de D. discoideum son ayunadas se desencadena -  
 el proceso de diferenciación (10).

Las células son orientadas y atraídas hacia centros que emiten -  
 pulsos periódicos de cAMP, que actúa de esta forma como agente -  
 quimiotáctico (212).

La capacidad de producir estas señales rítmicas de cAMP es carac -  
 terística de cierto tipo de células diferenciadas (213).

Las células responden a estos pulsos periódicos de cAMP a través  
 de receptores específicos para el nucleótido en la superficie ce -  
 lular (214). Esta respuesta supone un incremento de los niveles  
 intracelulares de cAMP que es posteriormente liberado al exte -  
 rior, contribuyendo a propagar y ampliar la señal iniciada (215)

De esta manera se produce la agregación coordinada de las amebas  
 de D. discoideum, dando lugar a un pseudoplasmodio que posterior -  
 mente se convertirá en un esporangio.

Existen varios elementos que intervienen en este fenómeno de di-

CAPITULO I	PAGINA 79	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

ferenciación mediado por el cAMP (214).

Se han caracterizado las distintas actividades de fosfodiesterasa de cAMP en D. discoideum, una extracelular y otra asociada a membrana (216). La enzima extracelular está directamente relacionada con el bloqueo de la señal ejercida por el cAMP; dicha señal es transducida desde el receptor al interior de la célula en forma rápida, de tal manera que el estímulo obedece a una rápida fluctuación de la concentración de cAMP, más que la respuesta a un valor determinado de sus niveles (214).

El factor de acoplamiento entre los efectos quimiotácticos del cAMP y los efectos inductores de la diferenciación, es la adenilato ciclasa.

La adenilato ciclasa de D. discoideum es una enzima asociada a membrana (217) que ha podido ser solubilizada por sonicación o por el empleo de Tritón X100 (218). Posee un peso molecular de 100000 D. y es activada por cAMP y 5' AMP (219).

El mecanismo molecular de la activación de la enzima por el cAMP a través de los receptores específicos del nucleótido en la cara externa de la membrana se desconoce. Sin embargo, la generación de los pulsos periódicos de cAMP por las células estimuladas obedece aparentemente a un fenómeno de activación e inactivación secuencial de la adenilato ciclasa (214)(220).

El proceso de diferenciación de D. discoideum desde la fase de crecimiento a la fase de agregación requiere varias horas durante las cuales el cAMP no sólo actúa como agente quimiotáctico, sino también como inductor de la diferenciación, favoreciendo la síntesis de determinadas proteínas imprescindibles para el proceso de agregación (221)(222).

#### XV.2. BLASTOCLADIELLA EMERSONII

CAPITULO I	PAGINA 80	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

El ciclo asexual de este ficomicete comienza con una célula flagelada sin pared celular (zoospora), uninucleada y con baja actividad metabólica.

En condiciones apropiadas al flagelo se retrae y se forma un tubo germinal (germinación), el cual origina posteriormente un sistema rizoidal que crece en forma rápida (fase vegetativa). Si los nutrientes se agotan se interrumpe el ciclo vegetativo y comienza la esporulación (223).

La actividad específica de la adenilato ciclasa cambia apreciablemente durante el ciclo de vida de este organismo. En la fase vegetativa la actividad es apenas detectable, sin embargo, durante la esporulación la enzima es sintetizada "de novo" y la actividad aumenta 70 veces. Este aumento es coincidente con el de la actividad fosfodiesterasa de cAMP, por lo que los niveles de dicho nucleótido permanecen invariables durante esta transición morfogénica (224).

Durante la germinación, las actividades específicas de la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa van disminuyendo gradualmente, no obstante, la desaparición de la actividad de esta última es más brusca. Esto se hace bien patente en la primera fase de la germinación, durante la transición de zoospora a célula redonda, previa a la aparición del tubo germinal, en la que los niveles de cAMP aumentan hasta cinco veces (225). Gomes y colaboradores pudieron inducir dicha diferenciación de las zoosporas con cAMP o inhibidores de la fosfodiesterasa (226).

Estos resultados sugieren un papel activo del cAMP durante la morfogénesis de B. emersonii.

La adenilato ciclasa de este organismo está asociada con la fracción de membranas, pudiendo obtenerse en forma soluble mediante el empleo de detergentes.

La enzima requiere específicamente  $Mn^{+2}$  para expresar su actividad y no es estimulada ni por fluoruro ni por catecolaminas. El verdadero sustrato de la enzima es el complejo MnATP y mientras

CAPITULO	I	PAGINA	81	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

que el ATP no es buen inhibidor competitivo, el 5' AMP y GTP si lo son.

Las representaciones de la actividad enzimática frente a la concentración del complejo MnATP son sigmoideas, pudiendo actuar el  $Mn^{+2}$  libre como activador a baja concentración de sustrato (227).

### XV.3 PHYCOMYCES

Se ha observado en el esporangióforo del ficomicete Phycomyces blakesleanus, que la estimulación de la luz no sólo origina un incremento en su velocidad de crecimiento, sino que provoca una variación rápida de los niveles de cAMP (228).

Durante los dos primeros minutos, después de dicha estimulación, los niveles de cAMP disminuyen un 60 % y vuelven rápidamente a los valores normales. Este pulso precede en un breve lapso de tiempo a la iniciación del crecimiento.

La adición de teofilina o cAMP al medio, provoca una rápida y transitoria disminución del crecimiento, lo que ha llevado a sugerir un papel activo del cAMP en el sistema de respuesta al desarrollo de este hongo (228).

La adenilato ciclasa de P. blakesleanus no ha podido ser asociada de manera concluyente con una fracción subcelular exclusiva, y aparentemente estaría débilmente unida a membrana.

Contrariamente a la adenilato ciclasa de otros hongos, la actividad enzimática es exclusivamente dependiente de  $Mg^{+2}$  y estimulable por ciertas catecolaminas. El  $Mn^{+2}$  y el  $F^-$  son inhibidores de la enzima (229).

Una interesante característica de esta adenilato ciclasa es que puede ser activada "in vivo" por la luz. Este hecho ha llevado a suponer que la enzima está implicada en el sistema de recep -

CAPITULO I	PAGINA 82	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

ción de luz de este organismo (229). Los rápidos cambios de los niveles de cAMP después de la estimulación por la luz parecen implicar tanto a la adenilato ciclasa como a la fosfodiesterasa.

#### XV,4 MUCOR

El ciclo de vida asexual de este ficomicete se puede resumir en tres etapas: germinación de esporangiosporas, crecimiento vegetativo y formación de esporangiosporas (230). Las esporas son células elipsoides con uno o dos núcleos que germinan en dos fases, siendo la primera un crecimiento manteniendo su forma y la segunda la aparición de un tubo germinal (si hay desarrollo de hifas) o de un brote esférico (si va a crecer como levadura). Ambos tipos de células vegetativas (hifas y levaduras) aparecen según sean las condiciones del medio, siendo en general favorables a las células levaduriformes la alta concentración de hexosa, la anaerobiosis, el incremento en la presión parcial de dióxido de carbono y la presencia de cAMP en el medio. De esta forma, modificando las condiciones de cultivo se puede pasar de un tipo celular a otro.

Larsen y Sypherd (231) en Mucor racemosus y Paveto y colaboradores (232) en Mucor rouxii encontraron que, cuando en los cultivos se cambia una atmósfera de dióxido de carbono por otra de aire, se produce una disminución de los niveles de cAMP y una transición de levaduras a la forma filamentosa. Sin embargo, cuando se agregó dibutiril-cAMP dicha transición no producía.

Paznokas y Sypherd (233) postularon que la capacidad respiratoria y la morfología no están obligatoriamente ligadas, no obstante, mientras que altos niveles de cAMP y una atmósfera de dióxido de carbono son determinantes de la forma levaduriforme, bajos niveles del nucleótido y aire lo son de la forma micelial.

CAPITULO	I	PAGINA	83	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

Cantore y colaboradores (234) hallaron en el desarrollo aeróbico de Mucor rouxii que los niveles de cAMP disminuyen durante la germinación, para restaurarse en el comienzo de la fase estacionaria. En dicha fase, el hongo expulsa el nucleótido cíclico al medio extracelular.

En extractos de Mucor rouxii, Paveto y colaboradores (232) demostraron que la actividad específica de la adenilato ciclasa no varía con la morfología del hongo. Esta enzima se encuentra principalmente en las fracciones particuladas, pudiendo solubilizarse parcialmente mediante la extracción con Lubrol PX (234).

Esta adenilato ciclasa, como la de otros hongos, es dependiente de  $Mn^{+2}$ , e insensible al  $F^-$  o el GTP.

Por otra parte, los niveles más altos de la enzima aparecen en las esporangiosporas, disminuyendo inmediatamente al comenzar la germinación, durante un ciclo aeróbico, para volver a elevarse al llegar a la fase estacionaria de crecimiento.

#### XV,5 COPRINUS

En una cepa monocariótica del basidiomicete Coprinus macrorhizus se encontró que el cAMP y el 3' AMP, inducen la formación de cuerpos de fructificación (235).

Existen ciertas mutantes monocarióticas que son capaces de desarrollar dichos cuerpos en presencia de luz, pero no pueden hacerlo en la oscuridad (236). Al pasar las mutantes de la oscuridad a la luz se induce la síntesis de la adenilato ciclasa.

El aumento de la actividad adenilato ciclasa presenta un máximo previo a la agregación de las células que forman los cuerpos de fructificación y disminuye inmediatamente (237).

Hoy en día se asume que el cAMP desempeña un importante papel en



CAPITULO	I	PAGINA	84	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

la formación de los cuerpos de fructificación en este basidiomicete, y se supone que su acción viene mediada por receptores protéicos intracelulares del nucleótido (235).

#### XV,6 SACCHAROMYCES

Levaduras del género Saccharomyces tales como, S. cerevisae o S. carlbergénesis, son anaerobios facultativos con capacidad para usar una gran variedad de azúcares, y otros compuestos orgánicos, como fuentes de carbono y energía.

Durante el crecimiento anaerobio, estos organismos se asemejan en algunos aspectos a bacterias tales como, E. coli; por ejemplo ambos tipos de organismos están sujetos a represión catabólica.

La evidencia del papel desempeñado por el cAMP en la inducción de la síntesis de determinadas proteínas sujetas a represión catabólica ha sido suficientemente documentada en lo que se refiere a E. coli (apartado 14.1).

En este sentido, la primera evidencia de un papel similar del cAMP en levaduras la obtuvieron, en 1971, Van Wijk y Konijn(238) Estos autores encontraron un aumento de los niveles de cAMP en las células de S. carlbergénesis, sometidas a un cambio de fuente de carbono y concluyeron que la cantidad intracelular de cAMP es más alta en células que muestran un menor grado de represión catabólica.

Unos años más tarde, Mahler y Lin (239) demostraron que el cAMP agregado a levaduras cultivadas en un medio con glucosa puede sustraerlas de la represión catabólica.

Por otra parte, Sy y Richter (240) observaron que células cultivadas en un medio con lactato o con bajo contenido en glucosa, doblaban sus niveles de cAMP en la fase estacionaria temprana,

CAPITULO	I	PAGINA	85	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

mientras que aquellas que eran cultivadas en un medio de alto - contenido en glucosa mantenía una baja concentración de cAMP durante todo el periodo de crecimiento.

Todas estas evidencias sugieren una relación directa entre los - niveles intracelulares de cAMP y el control de la represión catabólica en levaduras.

Los estudios realizados hasta la fecha no permiten evaluar el posible mecanismo molecular de dicho control. Una de las primeras cuestiones que se trata de resolver es la de comprender los procesos que se verifican a nivel de la membrana, que permiten modificar la actividad de la adenilato ciclasa y por ende los niveles de cAMP (241).

La adenilato ciclasa mejor caracterizada de este grupo de organismos es la de S. cerevisiae. Esta enzima se encuentra débilmente asociada a la membrana, ya que puede obtenerse una fracción - de la misma en forma soluble sin el uso de detergentes, si bien, el empleo de los mismos, aumenta el rendimiento de la solubilización (19).

Tanto la forma soluble de la enzima como la asociada a membrana fueron indistinguibles, según diferentes criterios.

Dicha adenilato ciclasa es dependiente de  $Mn^{+2}$  e insensible al - fluoruro. Cuando fué solubilizada mediante el empleo de Lubrol PX, se comportó como una proteína de 450000 D. de peso molecular en filtración en geles de agarosa (19).

#### XV,7 PROTOZOARIOS

##### - Tetrahymena piriformis

En el año 1973, Voichick y colaboradores demostraron que los niveles de cAMP variaban durante el crecimiento de este protozoo -

CAPITULO	I	PAGINA	86	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

ciliado (242).

La concentración de cAMP es alta durante la fase lineal del crecimiento, declina bruscamente y vuelve a aumentar en forma gradual al final de la fase estacionaria.

Esta variación de los niveles de cAMP es consecüente con la variación observada de las actividades adenilato ciclasa y fosfodiesterasa.

En este organismo el cAMP regula, al igual que en eucariotes superiores, el metabolismo de carbohidratos, actuando a nivel de la glucógeno sintetasa y la fosforilasa de glucógeno (242).

Por otra parte, existen experiencias preliminares que sugieren que el cAMP media la inhibición de la transcripción del gen de la galactoquinasa en este organismo (243).

La adenilato ciclasa de Tetrahymena pyriformis es una enzima muy semejante a la de organismos eucariotes superiores. La actividad es dependiente de  $Mg^{+2}$  y estimulable por fluoruro, adrenalina y serotonina (244).

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, la enzima de este protozoo está débilmente asociada a membrana y puede solubilizarse en una solución de sacarosa 0.25 M, manteniéndose la sensibilidad de la enzima a la adrenalina.

Si la solubilización se realiza en Tritón X100, la enzima pierde la capacidad de ser estimulada por adrenalina, sin embargo, conserva la sensibilidad a la serotonina (244).

#### - Trypanosoma cruzi

Este protozoo, responsable en el hombre de la enfermedad de Chagas existe en varios estados de diferenciación.

En el huésped vertebrado, la forma intercelular amastigote se reproduce por división binaria. En un momento dado cambia a la forma no reproductiva tripomastigote, que emerge del tejido para

CAPITULO	I	PAGINA	87	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

sitado, para pasar al torrente sanguíneo del huésped, pudiendo penetrar en otro tejido y reanudar el ciclo (245). Después de la succión de sangre de un huésped infectado por un insecto vector, la forma tripomastigote experimenta en el intestino del insecto la transformación a la forma epimastigote, que se reproduce activamente. Finalmente, en el recto una cierta proporción de epimastigotes experimentan la diferenciación a la forma infectiva - tripomastigote.

El ciclo de desarrollo de Trypanosoma cruzi en el insecto puede ser bastante bien reproducido "in vitro", no obstante, la diferenciación de la forma epimastigote a la forma tripomastigote es difícil de controlar en virtud de la carencia de conocimientos sobre las condiciones que regulan tal transformación.

En el año 1977, Franco da Silveira y colaboradores (246) describieron una actividad adenilato ciclasa en preparaciones particuladas de la forma epimastigote en T. cruzi. Al igual como ocurre con la enzima descrita en varios hongos, la actividad adenilato ciclasa de T. cruzi es dependiente de  $Mn^{+2}$  e insensible al fluoruro. El complejo Mn ATP es el verdadero sustrato de la enzima, actuando el ATP libre como inhibidor de la misma.

El papel del cAMP en este organismo se desconoce. Strickler y Patton (247) demostraron diferencias en los niveles de cAMP de las formas reproductiva y no reproductiva de T. lewisi.

#### XVI. NEUROSPORA CRASSA

Neurospora crassa es un hongo ascomicete perteneciente a la familia de las Sordariaceae. Al igual que todos los hongos de la clase Ascomycetes y la subclase Euascomycetidae, su cuerpo vegetativo está constituido por un micelio formado por un entreteji-

CAPITULO	I	PAGINA	88	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

do de hifas tabicadas. Los tabiques transversales no son completos, sino que tienen en el centro un poro por donde se continúan las membranas plasmáticas de las células adyacentes.

Las hifas se alargan por crecimiento apical y sus células pueden ser uni o multinucleadas. Los núcleos de las hifas vegetativas poseen un solo complemento cromosómico, es decir, son haploides.

La reproducción ocurre de manera asexual, por la formación de conidias o bien de manera sexual por la formación de ascosporas.

En el primer caso (ciclo asexual), el micelio vegetativo desarrolla hifas diferenciadas (conidióforos) en cuyos extremos se producen sucesivas divisiones mitóticas y fragmentaciones que dan origen a numerosas conidias o esporas asexuales. Las conidias, al encontrar un medio apropiado, germinan originando nuevamente el micelio haploide.

El ciclo de vida sexual ocurre si se encuentran dos micelios de tipo de apareamiento diferente (heterotalismo). En ambos micelios pueden desarrollarse estructuras femeninas y masculinas, pero la fecundación sólo se produce entre estructuras de emicelios heterotálicos. La parte femenina consta de estructuras pluricelulares llamadas protoperitecios, que en su interior contienen el órgano sexual femenino o ascogonio. El ascogonio es una célula globosa, con numerosos núcleos haploides, la cual emite una prolongación filiforme de su protoplasma llamada tricogino, que funcionará como un pelo aceptor de las células masculinas, las cuales pueden ser conidias, microconidias o, simplemente, hifas del micelio con tipo de apareamiento opuesto. Estos elementos masculinos descargan sus núcleos aploides en el interior del tricogino, los cuales se fusionan de a pares con los núcleos del ascogonio, generando numerosos núcleos diploides (proceso conocido como cariogamia). Cada núcleo diploide se dividirá meiosis originando cuatro núcleos haploides, y cada uno de éstos se divide por mitosis originándose así ocho ascosporas. Las ascosporas quedan localizadas en una estructura en forma de saco llamada ascoco. El protoperitecio luego se transforma en un peritecio, que

CAPITULO I	PAGINA	89	INTRODUCCION
------------	--------	----	--------------

es el cuerpo de fructificación en forma de botella característico de las Sordariaceae.

Cada peritecio posee entonces numerosos ascos portadores de ascoporas, éstas son células resistentes a condiciones ambientales adversas, que al germinar en el medio adecuado generan nuevamente el micelio vegetativo. En la figura 16 se esquematizan los ciclos biológicos de reproducción asexual y sexual de N. crassa (248).

#### XVI,1 METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN NEUROSPORA CRASSA

Estudios realizados por Takahara y Matsuda (249) y por Fontana y Krisman (250), mostraron que Neurospora sintetiza glucógeno como reserva de energía.

En cultivos realizados en presencia de glucosa como fuente de carbono se observó un contenido máximo de glucógeno en la fase exponencial tardía, que comenzó a decrecer al consumirse totalmente la glucosa del medio.

Los trabajos de Téllez de Iñón, Terenzi y Torres (251,252) demostraron que el mecanismo de regulación del metabolismo del glucógeno en Neurospora es similar al que ocurre en tejidos de mamíferos y distinto al que tiene lugar en bacterias.

La sintetasa del glucógeno de Neurospora aparece en dos formas interconvertibles. La forma I (activa) independiente de la glucosa -6-fosfato y la forma D (inactiva) que necesita dicho compuesto para expresar su actividad.

La conversión "in vitro" de la forma I a la forma D, requiere ATP y  $Mg^{+2}$ , mientras que la transformación inversa requiere sólo  $Mg^{+2}$ .

CAPITULO I	PAGINA 90	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

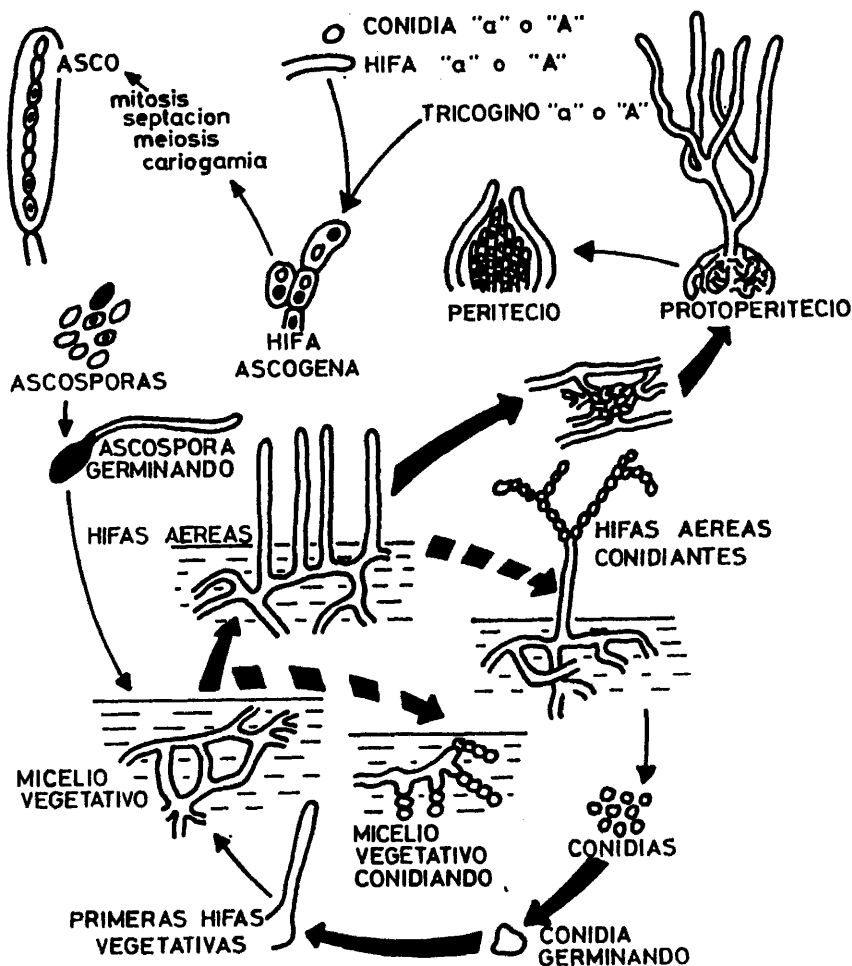


Figura 16. Ciclo biológico de *Neurospora crassa*. Las flechas gruesas llenas indican los posibles pasos estimulados por el cAMP. Las flechas gruesas punteadas, los pasos inhibidos por el nucleótido.

CAPITULO	I	PAGINA	91	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

Téllez de Iñón y Torres (252) estudiando la fosforilasa de glucógeno, demostraron que dicha enzima se presenta también en dos formas interconvertibles: la forma a (activa) y la forma b (inactiva), que necesita 5' AMP para expresar su actividad. La conversión de la forma b a la forma a ocurre en presencia de ATP y  $Mg^{+2}$ , siendo estimulada por cAMP en concentraciones del orden de  $0.1 \mu M$ .

Finalmente, Téllez de Iñón y Torres (253) identificaron las enzimas que modulan la fosforilasa de glucógeno: la quinasa de proteínas que actúa sobre la fosforilasa b y la fosfatasa de fosfoproteínas que actúa sobre la fosforilasa a. Dicha fosfatasa también existe en dos formas interconvertibles y nuevamente se requiere ATP y  $Mg^{+2}$  para obtener la forma más activa.

## XVI,2 ADENILATO CICLASA

En 1972 Flawiá y Torres (13), describieron la existencia de una actividad de adenilato ciclase en lisados celulares de un mutante "slime" de N.crassa (FGSC 1118). Esta mutante carece de la pared celular polisacárida característica del micelio y crece como protoplastos aislados. La enzima fué asociada con la fracción particulada, es totalmente dependiente de  $Mn^{+2}$  para su actividad y no puede ser activada por fluoruro ni por GTP, ACTH o catecolaminas. Además, los mismos autores comprobaron que el verdadero sustrato de la enzima es el complejo MnATP, que el ATP puede funcionar como inhibidor desplazando al sustrato del sitio catalítico y que el  $Mn^{+2}$  funciona como activador de la enzima sólo a bajas concentraciones del sustrato (254).

La enzima fué solubilizada por tratamiento de las membranas con el detergente no iónico Lubrol PX, y fué parcialmente purificada por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Se determinó para la enzima un constante de sedimentación de 7.1 S (255).



CAPITULO	I	PAGINA	92	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

Por otra parte, cuando se incubaron membranas de N. crassa "slime" con glucagón, se observó estimulación de la actividad adenilato ciclasa (256).

El glucagón no activó a la ciclasa solubilizada con Lubrol PX. Además, al agregar glucagón a un cultivo del hongo, se observó un incremento en la velocidad de glucogenólisis, un incremento en la actividad de la fosforilasa del glucógeno y una disminución en la actividad de la sintetasa del glucógeno. Todos estos efectos corroboran las similitudes existentes entre los mecanismos de control del metabolismo del glucógeno de N. crassa y células animales.

Además del efecto del glucagón, Flawiá y Torres encontraron que la adenilato ciclasa de la mutante "slime" es inhibida por insulina de un modo pseudocompetitivo (257). La inhibición es contrarrestada por glucagón y sólo se observa a bajas concentraciones del sustrato MnATP. La actividad de la enzima no es modificada por las cadenas polipeptídicas aisladas de la insulina (A y B), ni por otras hormonas peptídicas que contienen puentes disulfuro como la vasopresina o la hormona del crecimiento (258).

### XVI,3 FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS Y QUINASAS DE - PROTEINAS

Scott y Solomon (259) encontraron actividad fosfodiesterasa de cAMP asociada a fracciones particuladas de extractos de Neurospora crassa. Dicha actividad es inhibida por metilxantinas, ADP y ATP. Por otra parte, se demostró que la enzima presenta dos valores de Km para el cAMP, que difieren en más de dos órdenes de magnitud.

Estudios recientes de Téllez de Iñón y colaboradores (260) han permitido caracterizar dos actividades distintas de fosfodiester-

CAPITULO	I	PAGINA	93	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

rasa de nucleótidos cíclicos en la fracción soluble de extractos miceliales de Neurospora crassa. Dichas actividades fueron denominadas fosfodiesterasa I y II, según el orden de elución de una cromatografía en columna de DEAE-celulosa. La fosfodiesterasa I tiene como sustratos tanto cAMP como cGMP, mientras que la fosfodiesterasa II sólo actuó sobre el cGMP.

Gold y Segel (261) describieron una actividad quinasa de proteínas soluble, proveniente de extractos de Neurospora crassa. Sólo caseína y fosvitina resultaron buenos sustratos en las condiciones usadas por dichos autores. Esta actividad, independiente de cAMP, tuvo un coeficiente de sedimentación de 3.8 S, un peso molecular de 60000 D. y un Km para el ATP de 30  $\mu$ M.

Más tarde, Judewicz, Glikin y Torres (262) describieron, en presencia de tres actividades de quinasa de proteínas en la fracción soluble de extractos miceliales de Neurospora crassa, cosechados en la fase logarítmica de crecimiento. Estas actividades enzimáticas fueron resueltas por cromatografía en DEAE-celulosa y una de ellas es estimulable por cAMP. Esta quinasa de proteína dependiente de cAMP posee un peso molecular de 118000 D. y está constituida por dos subunidades, una catalítica y una regulatoria, cuyos pesos moleculares son 55000 D. y 57000 D., respectivamente (263).

#### XVI,4. PAPEL DEL cAMP EN LA DIFERENCIACION DE NEUROSPORA CRASSA

El ciclo de vida asexual de la cepa salvaje de N. crassa puede ser dividido en los siguientes pasos:

1. Germinación de las conidias y formación de hifas vegetativas
2. Elongación y ramificación de las hifas vegetativas formando un micelio sumergido en medio líquido, o rastrero en medio -

CAPITULO	I	PAGINA	94	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

sólido.

3. Diferenciación de hifas que se alargan alejándose de la superficie del medio (hifas aéreas).
4. Formación de cadenas de conidias en los extremos de las hifas aéreas (figura 16).

Existe una familia de mutantes de Neurospora denominada "crisp", que se caracteriza por poseer un fenotipo colonial, con ausencia total de hifas aéreas y una acumulación prematura de conidias sobre la superficie del medio de cultivo.

El fenotipo "crisp" está determinado por mutaciones en algunos de los tres loci diferentes: cr-1, cr-2 y cr-3. Estos loci no son alélicos y están localizados en el brazo derecho del grupo de ligamiento I del hongo (N. crassa tiene siete grupos de ligamiento en las cercanías del centrómero).

En 1975, Torres y colaboradores (264) observaron que una cepa "slime" de N. crassa, la FGSC 326, presentaba una actividad de adenilato ciclasa muy reducida respecto de la cepa FGSC 1118, utilizada en los estudios descritos anteriormente. La cepa "slime" 326, había sido aislada por mutagénesis de una cepa micelial, la FGSC 329. Esta última poseía fenotipo "crisp" y también presentaba muy baja actividad de adenilato ciclasa. Haciendo una evaluación de la actividad enzimática en diferentes cepas del hongo, los autores, demostraron que sólo las cepas portadoras de la mutación cr-1 tenían bajos niveles de actividad adenilato ciclasa. Las mutaciones cr-2, cr-3, que presentan el mismo fenotipo que la cr-1, tienen actividad adenilato ciclasa normal (264)(265).

Además Terenzi y colaboradores (265) demostraron que la morfología "crisp" de los mutantes cr-1, era consecuencia de la reducción en la síntesis de cAMP, ya que la adición del nucleótido cíclico o de su derivado, el dibutiril cAMP al medio de cultivo, hacía que la mutante cr-1 adoptara un fenotipo similar al de las

CAPITULO	I	PAGINA	95	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

cepas salvajes (fenocopia). Sin embargo, la adición de cAMP a los medios de cultivo de las cepas cr-2 y cr-3, no revierte la morfología "crisp", hecho que podría indicar que estas mutantes presentan lesiones en alguna etapa de las rutas metabólicas controladas por el cAMP.

Confirmando los hallazgos anteriores, el mismo grupo determinó que los niveles intracelulares de cAMP eran de diez a veinte veces más altos en las cepas salvajes que en las portadoras de la mutación cr-1 (266).

Por otra parte, Trevillgan y Pall (267)(268) probaron en Neurospora que antibióticos activos sobre membrana plasmática, como la nistatina, producen despolarización de la misma, con un rápido incremento transitorio de los niveles de cAMP. Las mutantes cr-1 no presentan dicho efecto, que se debería a un estímulo sobre la adenilato ciclasa unida a membrana.

Scott y Solomon (269), ensayaron el efecto de distintas drogas que disminuyen los niveles de cAMP por inhibición de la adenilato ciclasa o por activación de la fosfodiesterasa. En estas condiciones, el micelio de las cepas salvajes adopta un crecimiento colonial o semicolonial, semejante al de mutantes morfológicas.

Si bien, aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares de la acción del cAMP sobre el control de la morfología en N. crassa, recientemente han aparecido dos contribuciones que tienden a dilucidar este interrogante. En primer lugar, Judewicz y Torres (270), encontraron que el cAMP estimula la fosforilación de núcleos de cepas "slime" de N. crassa. La fracción de proteínas nucleares que se fosforila preferentemente es la de proteínas no histiónicas de la cromatina. Además, comprobaron que la capacidad de transcribir RNA mensajero es mayor en la cromatina extraída de núcleos fosforilados que en la obtención de núcleos no fosforilados. Estos resultados podrían indicar que una posible vía de la regulación por cAMP ocurriría a nivel de la transcripción de determinadas secuencias genómicas.

Por último, Judewicz, Glikin y Torres (262), observaron que la

CAPITULO	I	PAGINA	96	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

actividad quinasa de proteína dependiente de cAMP de N. crassa, sólo es detectable en la etapa temprana del crecimiento del hongo, hecho que concuerda con el papel estimulador de la formación de hifas aéreas que cumple el nucleótido en este periodo.

#### XVII. cAMP Y ADENILATO CICLASA EN HONGOS. GENERALIDADES

##### XVII,1 FUNCIONES PROPUESTAS PARA EL cAMP

En eucariotes superiores han sido fijados cinco criterios que deben cumplirse para asegurar que un determinado efecto hormonal fuera mediado por cAMP (apartado IV). En hongos, sin embargo, los criterios sugeridos para determinar si en el control de una función concreta está implicado el cAMP deben ser considerados con un punto de vista distinto, debido a que los posibles papeles del cAMP en hongos no están necesariamente relacionados con las funciones de este nucleótido como "segundo mensajero".

Para asignar al cAMP el control en hongos de una función concreta se han sugerido los siguientes criterios (271):

1. La correlación de los niveles endógenos de cAMP con la función controlada por el nucleótido.
2. La correlación de la función con la activación de presuntos receptores del cAMP (por ejemplo, la activación de quinasas de proteínas dependientes de cAMP).
3. La influencia del cAMP exógeno, o algunos de sus análogos sobre la función bajo estudio.
4. La influencia sobre dicha función de drogas que afecten a la

CAPITULO I	PAGINA 97	INTRODUCCION
------------	-----------	--------------

adenilato ciclasa o la fosfodiesterasa, habiéndose demostrado que dichas drogas afectan los niveles intracelulares de - cAMP.

5. Cambios de la función en mutantes con los niveles de cAMP alterados.
6. El control de la función por cAMP, "in vitro", en un sistema libre de células.

Todos estos criterios, excepto el 2º, han sido bien evaluados en algunos casos, no obstante, existen ciertos condicionamientos experimentales dependientes de la función bajo estudio que deben - ser tenidos en cuenta, por ejemplo, las respuestas bioquímicas - de una función pueden ser fácilmente evaluadas "in vitro", pero, sin embargo, no siempre es posible el estudio de los efectos del cAMP sobre el desarrollo de un organismo en un sistema libre de células. Por otra parte, no siempre puede contarse con mutantes de un determinado hongo con los niveles de cAMP alterados.

Las funciones sugeridas para el cAMP en hongos, se resumen en la Tabla IV.

## XVII,2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

La adenilato ciclasa en organismos eucariotes superiores, se encuentra fuertemente asociada a membrana, ésto ha sido uno de los principales inconvenientes a la hora de llevar a cabo la purificación a homogeneidad de la enzima. Hasta la fecha se ha des - crito sólo la purificación a homogeneidad de dos adenilato cicla sas: La de Brevibacterium liquefaciens (210) y la enzima soluble de testículo de rata (29). En ninguno de los dos casos, sin embargo, las enzimas purificadas poseen un tamaño semejante al des crito para las adenilato ciclasas de organismos eucariotes supe -

CAPITULO	I	PAGINA	98	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

riores, cuyo tamaño oscila entre 200 y 240000 D.

Así pues, el primer objetivo del presente trabajo fué la solubilización y purificación a homogeneidad de la adenilato ciclase - de N. crassa, así como la realización de un estudio de caracterización molecular de la enzima.

Los estudios preliminares sobre la adenilato ciclase en hongos, han puesto de manifiesto, entre otras cosas, que en estos organismos, a diferencia de lo que ocurre en organismos eucariotes superiores, la enzima es fuertemente dependiente de  $Mn^{+2}$  para expresar su actividad catalítica.

Existen ciertas semejanzas entre el componente catalítico del sistema adenilato ciclase sensible a hormonas de células animales y la enzima de N. crassa. Destacan, entre ellas, además de la fuerte dependencia de  $Mn^{+2}$  para la expresión de la actividad catalítica, la insensibilidad tanto a hormonas como a nucleótidos de guanosina, toxina del cólera o fluoruro.

De esta forma, el segundo objetivo del presente trabajo fué el estudio de la relación existente entre el componente catalítico C del sistema adenilato ciclase de células animales y la enzima de N. crassa, para lo cual, además de los estudios de caracterización de ésta, se plantearon experimentos de reconstitución de un sistema adenilato ciclase dependiente de  $Mg^{+2}$  y sensible a hormonas utilizando el componente regulador N de eritrocito de pavo y la adenilato ciclase de N. crassa.

La adenilato ciclase de células animales es regulada principalmente por la acción de diversas hormonas. En bacterias, la enzima es regulada aparentemente por los sistemas de transporte de azúcares, mientras que los posibles mecanismos de regulación de la adenilato ciclase en hongos se desconocen.

De esta manera, se planteó como tercer objetivo, la búsqueda de posibles moduladores biológicos de la actividad adenilato ciclase en N. crassa para tratar de comprender los posibles mecanismos de regulación de esta enzima "in vivo".

CAPITULO	I	PAGINA	99	INTRODUCCION
----------	---	--------	----	--------------

Las dificultades de purificación de la adenilato ciclasa en la mayoría de los sistemas biológicos estudiados, ha impedido, entre otras cosas, la obtención de anticuerpos específicos para esta enzima. Por ello, como objetivo derivado del de la purificación de la enzima, se planteó la obtención de anticuerpos monoclonales para la adenilato ciclasa de N. crassa.

En líneas generales, se puede decir que el objetivo de la presente Tesis, ha sido el estudio de la adenilato ciclasa de Neurospora crassa, para lo cual se han marcado las siguientes pautas de trabajo:

- Purificación y caracterización molecular
- Estudio de la relación existente entre esta enzima y la de organismos eucariotes superiores.
- Estudio de moduladores biológicos y posibles formas de regulación.
- La obtención de anticuerpos monoclonales.



CAPITULO I	PAGINA 100	INTRODUCCION
------------	------------	--------------

TABLA IV. FUNCIONES SUGERIDAS PARA EL cAMP EN HONGOS

<u>ORGANISMO</u>	<u>POSIBLE FUNCION</u>
B. emersonii	Estimulación de la germinación
Mucor	Influencia la morfología
Neurospora	Activación de la glucogenolisis Influencia la morfología
Saccharomyces	Desrepresión catabólica Degradación de trehalosa
P. blakesleanus	Media el fototropismo Cambios en la distribución de $Ca^{+2}$
C. macrorhizus	Formación de cuerpos de fructificación

CAPITULO II	PAGINA 101	MATERIALES Y METODOS
-------------	------------	----------------------

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO II	PAGINA 102	MATERIALES Y METODOS
-------------	------------	----------------------

### I. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Como fuente de material biológico se utilizó la cepa salvaje de Neurospora crassa St. Lawrence 74 (StL 74).

Se la cultiva en medio Vogel mínimo (272) con sacarosa 2 % (P/v) como fuente de carbono, conteniendo 2.5  $\mu$ g/ml de biotina. Los cultivos se desarrollan con agitación rotatoria (100 rpm) a 30°C con matraces de Erlenmeyer de 2000 ml con tapa de algodón conteniendo 500 ml de medio. Los cultivos se cosechan a las 30 - 35 horas de hecho el inóculo.

El micelio se recoge por filtración con vacío en embudo Büchner, y se lava el contenido de cada Erlenmeyer con 500 ml de agua destilada fría. A continuación, el material se congela a -20° C y liofiliza.

### II. HOMOGENEIZACION Y FRACCIONAMIENTO

El material seco se pulveriza con la ayuda de un mortero. El polvo obtenido se homogeneiza en un vaso de precipitados en presencia de nitrógeno líquido. Para ello, se usó un equipo Ultra-Turrax (desintegrador de tejidos, modelo T 18/10, IKA), aplicando la máxima velocidad durante 1 minuto. Esta preparación se repite dos veces más. Seguidamente, se deja evaporar el nitrógeno y se resuspende el material en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (medido a 4° C) (tapón A) conteniendo PMSF 5 mM, en una proporción de 20 - ml por gramo de micelio seco. El material se homogeneiza nuevamente con Ultra-Turrax, manteniéndose el vaso de precipitados sumergido en baño de hielo. El extracto obtenido se centrifuga a 1100 x g durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido se

CAPITULO	II	PAGINA	103	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

centrifuga a 12000 x g durante 10 minutos a 4° C y finalmente el sobrenadante que se obtiene se centrifuga a 105000 x g durante - 120 minutos a 4° C.

Este último sobrenadante será denominado S<sub>105</sub> y constituye la - fracción soluble del micelio, mientras que el sedimento corres - pondiente será denominado P<sub>105</sub> y constituye la fracción particu - lada del mismo.

### III. OBTENCION Y PERMEABILIZACION DE CONIDIAS

Se parte de un micelio húmedo, que se obtiene como se especifica en el apartado I, y se deja conidiar bajo campanas de vidrio con luz artificial durante 48 horas. Al término de este tiempo, el micelio se introduce en matraces de Erlenmeyer de 2000 ml, conte - niendo agua destilada fría (50 ml/gramo micelio húmedo), los cua - les se someten a fuerte agitación manual, con el fin de provocar la liberación de las conidias. A continuación, la suspensión se filtra a través de lana de vidrio y el filtrado se centrifuga a 1100 x g durante 15 minutos a 4° C. Finalmente, las conidias se resuspenden en un volumen adecuado de agua destilada fría (apro - ximadamente 1 ml/50 g micelio de partida).

La permeabilización de las conidias, se lleva a cabo de la si - guiente manera:

A un volumen de la suspensión de conidias se le añaden: 0.5 volú - menes de tampón A y 0.1 volúmenes de tolueno - etanol (1:4 v/v); se agita vigorosamente durante 2 minutos a temperatura ambiente y las conidias permeabilizadas son sedimentadas a 1100 x g duran - te 15 minutos a 4° C.

CAPITULO	II	PAGINA	104	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

#### IV. PREPARACION DEL SUSTRATO RADIATIVO DE LA ADENILATO CICLASA

##### $[\alpha^{32}\text{P}]$ ATP

El método de ensayo de la adenilato ciclase usado en el presente trabajo, se basa en la cuantificación del cAMP marcado radiativamente con  $^{32}\text{P}$ , para lo cual se utiliza como sustrato ATP marcado con  $^{32}\text{P}$  en la posición  $\alpha$ , ya que éste es el único fosfato que se conservará en la molécula del producto, luego de la catálisis enzimática (figura 17).

La síntesis del  $[\alpha^{32}\text{P}]$  ATP, se realiza por el procedimiento descrito por Flawiá y Torres (13). Este método consta de dos pasos:

1. Síntesis química, que implica la esterificación del  $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$  con el oxidrilo en posición 5' de la isopropilidenadenosina

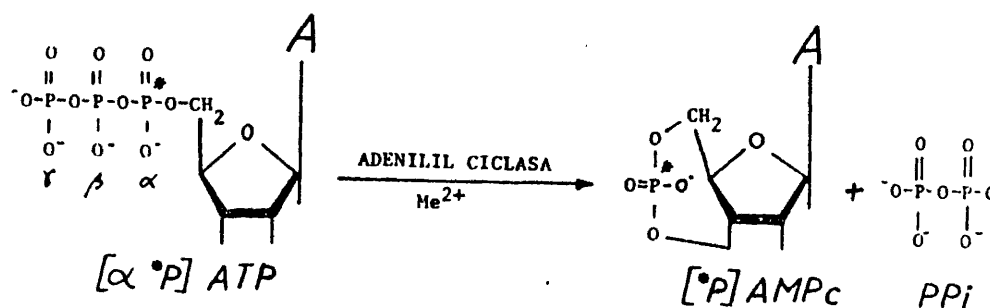
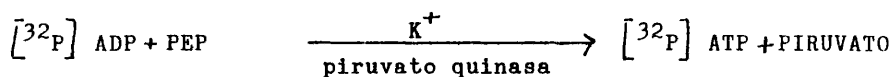
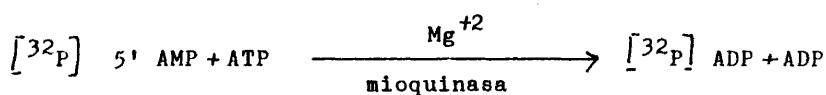


Figura 17

(figura 18), seguida de una hidrólisis ácida del grupo isopropilideno, para obtener 5'AMP marcado con  $^{32}\text{P}$ .

CAPITULO	II	PAGINA	105	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

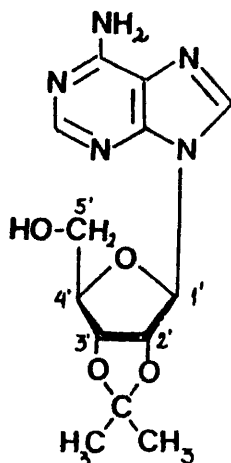
2. Síntesis enzimática, del  $[^{32}\text{P}]$  ATP, usando como material de partida el producto de la reacción anterior:



Se procede de la siguiente manera:

la solución clorhídrica de fosfato inorgánico radiactivo (50mCi) se lleva a sequedad en un evaporador rotatorio. El sedimento se resuspende en 3-4 ml de agua destilada, agregándose 5 moles de

Figura 18. Isopropilidén adenosina.



fosfato inorgánico. Se vuelve a evaporar a sequedad y a resus - pender el sedimento en 3-4 ml de agua destilada. Este procedi - miento se repite tres veces, con el objeto de eliminar por com - pleto al ácido clorhídrico en que viene disuelto el  $^{32}\text{Pi}$ . Al se - dimento de la última evaporación se le agregan 60 mg de isopropi

CAPITULO	II	PAGINA	106	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

liden-adenosina y 4-5 ml de acetonitrilo, y se evapora a sequedad.

El sedimento se resuspende en 4-5 ml de acetonitrilo y se evapora nuevamente a sequedad. Este procedimiento se repite dos veces más.

Una vez que está la preparación totalmente seca, se realiza la síntesis química:

se prepara una mezcla de 3.2 ml de dimetilsulfóxido (solvente), 20  $\mu$ l de tricloroacetonitrilo (agente condensante) y 25  $\mu$ l de trietilamina (catalizador). Se agrega rápidamente la mezcla al balón de reacción que contiene el  $^{32}\text{P}$ i y la isopropoliden-adenosina. Se tapa herméticamente y se incuba a 37° C durante 15 minutos.

A continuación se agregan 6 ml de ácido acético 5N y se calienta en baño de agua a 100 ° C con el balón destapado durante 1 hora (hidrólisis). Al cabo de este tiempo, el contenido del balón se evapora a sequedad, se resuspende en 3-4 ml de agua destilada y se evapora nuevamente. Este procedimiento se repite cuatro veces.

#### Síntesis enzimática:

el sedimento de la última evaporación ( $^{32}\text{P}$ ] 5' AMP) se incuba durante 20 minutos a 37° C en una mezcla de la siguiente composición:

tampón TRIS -HCl	100 mM pH: 7.4
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
K Cl	100 mM
ATP	0.16 mM
PEP (fosfoenolpirúvico)	7.5 mM
piruvato quinasa	20 $\mu$ g/ml
mioquinasa	200 $\mu$ g/ml

El volumen total es de 3.2 ml y la reacción se detiene por el agregado de 3 ml de metanol, calentando luego, en baño de agua a

CAPITULO	II	PAGINA	107	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

100° C durante 3 minutos.

Una vez finalizada la síntesis enzimática, el contenido del balón se siembra en una columna de DEAE-Sephadex A25. Forma bicarbonato, con un lecho de resina de 1x9 cm, previamente lavada y equilibrada con agua destilada. Una vez que la muestra penetra en la columna cromatográfica, se eluye con un gradiente continuo formado por agua destilada y bicarbonato de trietilamina 1M pH: 7.5. El volumen total del gradiente es de 200 ml. Se recogen fracciones de 7-8 ml y la presencia de radiactividad en cada fracción se estima semicuantitativamente, mediante el uso de un monitor marca Nuclear, modelo FM.

Un perfil típico de la columna de DEAE-Sephadex se muestra en la figura 19.

Se juntan las fracciones correspondientes al pico de ATP y se evapora a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo se resuspende en 5 ml de metanol. Se evapora nuevamente y por último se resuspende el sedimento de un volumen apropiado de agua destilada (generalmente de 1-4 ml).

La caracterización del ATP radiactivo se efectúa por cromatografía ascendente en hojas de polietilen-imino-celulosa, conteniendo reactivo fluorescente, usando como solvente cloruro de litio 1.5 M.

La posición de los nucleótidos utilizados como patrones (ATP, ADP y AMP) se detectó bajo luz U.V., emitida por una fuente marca Mineralight.

#### V. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA

La composición de la mezcla de incubación es: Tris-HCl 50 mM pH:



CAPITULO	II	PAGINA	108	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

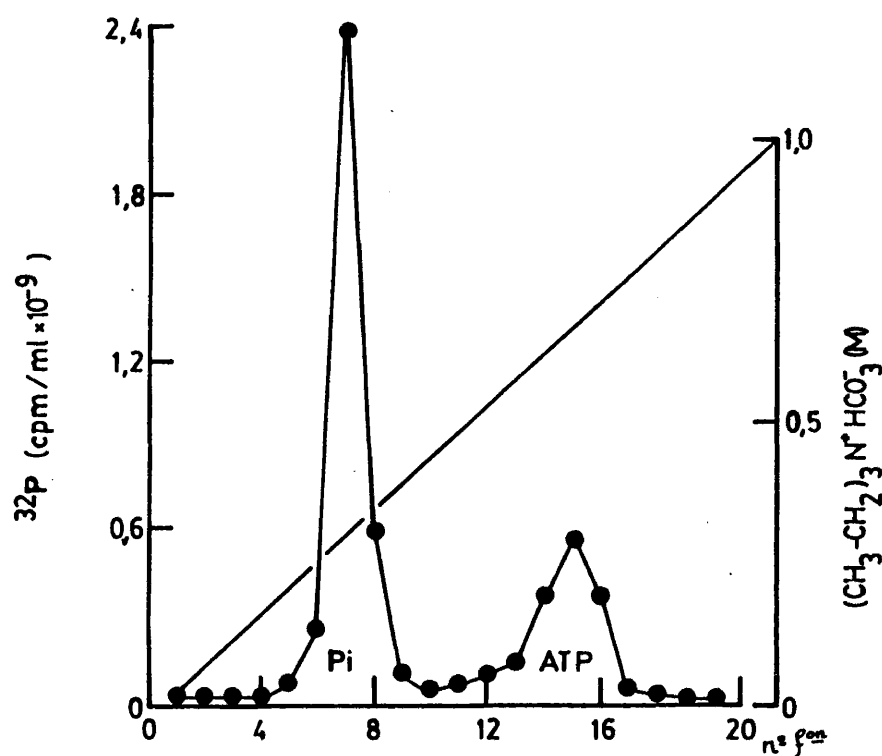


Figura 19. Perfil de elución de una cromatografía en DEAE-Sephadex A25, correspondiente a la mezcla de reacción después de la síntesis enzimática para la obtención de  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP. Se aplicaron 3-4 ml a una columna con un lecho de resina de 1x9 cm equilibrada con agua destilada. Una vez pasada la muestra se aplicó un gradiente lineal formado por agua destilada y bicarbonato de trietilamina 1M pH: 7.5. El volumen total del gradiente es de 200 ml y se recogen fracciones de 7 ml a un flujo de elución de 1 ml/min. Se estima la radiactividad en cada fracción semicuantitativamente con un monitor (●).

CAPITULO	II	PAGINA	109	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

7.5, 3-isobutil-1-metilxantina 0.2 mM, cAMP 1 mM, Mn Cl<sub>2</sub> o Mg - Cl<sub>2</sub> 2 mM, [ $\alpha$ <sup>32</sup>P] ATP 0.5 mM (con una actividad específica que va-  
ría entre 50 y 200 cpm por pmol), fosfocreatina 2 mM y fracción  
enzimática (50 a 200  $\mu$ g de proteína). El volumen total es de -  
0.1 ml y las incubaciones se realizan a 37° C durante 3-10 minu-  
tos. La reacción enzimática se detiene por el agregado de una -  
solución que contiene ATP 40 mM, [<sup>3</sup>H] cAMP 12.5 mM (actividad es-  
pecífica 3800 cpm por mol) y por calentamiento durante tres minu-  
tos en baño de agua a 100° C (273).

El cAMP formado se purifica siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas Dowex 50 y alúmina descrito por Solomon et al (274). La base del método consiste en separar el cAMP radiactivo de los otros nucleótidos (ATP, ADP, AMP), del Pi y el PPI a través de una resina intercambiadora de cationes (Dowex 50); los H<sup>+</sup> de la resina se intercambian con los -NH<sub>2</sub><sup>+</sup> de la adenina. El cAMP es el único compuesto de fosfato parcialmente retenido por la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es totalmente contrarrestada por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego de pasar por la Dowex 50, el cAMP es adicional-  
mente purificado en una columna de alúmina que retiene a todos -  
los fosfatos que pudieran aún contaminar al nucleótido cíclico. En esta columna el cAMP no se retiene a pH neutro.

Los pasos de purificación del cAMP se detallan a continuación:

Una vez detenida la reacción enzimática, se agrega 1 ml de agua destilada a la muestra y se siembra en una columna de Dowex AG - 50 W-X4 (200-400 mesh) forma H<sup>+</sup> con un lecho de resina de 4x0.5 cm. Una vez que pasa la muestra, se lava con 5 ml de agua desti-  
lada en dos etapas, una de 1 ml y otra de 4 ml, descartándose -  
los eluidos. Luego se pasan 6 ml de agua, recogiendo el elui-  
do directamente sobre una columna de alúmina neutra, con un le-  
cho de resina de 3x0.5 cm, previamente equilibrada con Imidazol-  
HCl 0.1 M pH 7.5. Una vez pasados los 6 ml, por la columna de alúmina, y habiéndose desechado el eluido correspondiente, se la-  
va la columna con 1 ml del tampón de equilibrado y luego con 4 -

CAPITULO	II	PAGINA	110	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

ml del mismo tampón, recogién dose éste último eluido en frascos de centelleo líquido. La radiactividad se mide según el método de Bray (275), añadiendo a los frascos 13.5 ml de la mezcla centelleadora (naftaleno-dioxano).

Las lecturas se hicieron en un contador de centelleo Beckman LS-8100, usando el programa 6 del mismo, con lectura para  $^3\text{H}$  y  $^{32}\text{P}$ . El CAMP tritiado, agregado al finalizar la incubación, permite calcular el porcentaje de recuperación del CAMP después de pasar por las columnas.

#### VI. PREPARACION DE HEXIL AMINO AGAROSA

Para la preparación de hexilaminosepharosa, que se usó posteriormente en uno de los pasos de purificación de la adenilato ciclasa, se siguió el procedimiento descrito por Cuatrecasas (276).

A 50 g de sepharosa 4B, previamente lavada, se añaden 50-60 ml - de agua destilada. Permaneciendo dicha suspensión con agitación magnética, en baño de hielo, se agregan 50 ml de una solución de BrCN (0.2 g/ml), manteniéndose el pH en un valor de 11, con ayuda de una solución NaOH 4N. Una vez estabilizado el pH, se filtra la resina con vacío en embudo Büchner y se lava con 500 ml - de agua destilada y 500 ml de una solución  $\text{Na CO}_3\text{H}$  0.1 N. A continuación, se vierte la resina en un vaso de precipitados, conteniendo 80 ml de una solución 1.6 diaminohexano en  $\text{Na CO}_3\text{H}$  1 M - (0.15 g/ml), llevada previamente a pH 8 con HCl concentrado. Esta suspensión se mantiene con agitación magnética a 4° C durante 16-20 horas. Al cabo de este tiempo, se lava la resina con, aproximadamente, 1 litro de agua destilada y se mantiene en una solu

CAPITULO	II	PAGINA	111	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

ción etanolamina 1M con agitación magnética a 4° C durante 2-3 - horas.

Finalmente, la resina se filtra y se lava extensivamente con - agua destilada.

#### VII. PURIFICACION DE LA ADENILATO CICLASA

50 g de micelio seco se homogeneizan en 1000 ml de Tris-H Cl 50 mM pH: 7.4 (tampón A), conteniendo EDTA 0.5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, Na Cl 0.5 M y glicerol 5 % (v/v). La homogeneización y el fraccionamiento posterior se realizan tal como se especifica en el apartado II de esta sección de "Materiales y Métodos".

La fracción S<sub>105</sub> obtenida, se dializa durante 18-20 h a 4° C, - frente a 20 volúmenes de tampón A, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y glicerol 5 % (v/v). Todos los pasos siguientes de purifi- cación se realizan a 2-4° C.

##### VII,1 CROMATOGRAFIA EN HEXILAMINO-SEPHAROSA

La fracción S<sub>105</sub> dializada (1000 ml, 3 mg proteína/ml) se aplica a una columna de Hexilamino-sepharosa preparada tal como se espe- cifica en el apartado V de esta sección de "Materiales y Métodos" con un lecho de resina de 3x20 cm y equilibrada con tampón A, - conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. Después de cargar la muestra en la columna, ésta se lava con 500 ml del tampón de equilibrio y se aplica un gradiente lineal formado por: tampón A, conteniendo



CAPITULO	II	PAGINA	112	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

do 2-mercaptoetanol 1 mM y tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM Na Cl 0.7 M. El volumen total del gradiente es de 1000 ml, el flujo de elución es de 2 ml/min. y se recogen fracciones de 25 ml. Las fracciones con actividad de adenilato ciclasa se combinan, constituyendo lo que se denominará preparación hexilamino-sepharosa (75-80 ml).

#### VII,2. FILTRACION EN GEL DE AGAROSA

La preparación hexilamino-sepharosa, se concentra por ultrafiltración usando una membrana Amicón PM 30, hasta un volumen de 7 ml (25 mg proteína/ml), y se aplica a una columna Pharmacia de Bio Gel A-5m (100-200 mesh) (intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares: 10000-5000000), con un lecho de gel de 2.5 x 87 cm y equilibrada en tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. La elución se realiza con el mismo tampón de equilibrado a un flujo de 2.5 ml/min, recogiendo fracciones de 7 ml. Las fracciones con mayor actividad específica se combinan constituyendo lo que se denominará preparación Bio-Gel.

#### VII,3 CROMATOGRAFIA EN AZUL SEPHAROSA

La preparación Bio-Gel (50 ml), se concentra por ultrafiltración usando una membrana Amicón PM 30 hasta un volumen de 12-15 ml, y se aplica a una columna de azul sepharosa con un lecho de resina de 0.9x15 cm y equilibrada en tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. Después de cargar la muestra en la columna, ésta se lava con 30 ml de tampón de equilibrado y se aplica un gradiente lineal formado por: tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM

CAPITULO	II	PAGINA	113	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

y tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM, NaCl 0.8 M. El volumen total del gradiente es de 120 ml. El flujo de elución es de 1.5 ml/min y se recogen fracciones de 5 ml. Las fracciones con actividad de adenilato ciclase se combinan constituyendo lo que se denominará preparación Azul-Sepharosa I.

La preparación Azul-Sepharosa I (25 ml) se dializa durante 18-20 horas a 4°C frente a 20 volúmenes de Tris-HCl 20 mM pH: 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. Dicha muestra, una vez dializada se aplica nuevamente a una columna de azul-sepharosa, con un lecho de resina de 0.9x15 cm, equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH: 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. Una vez cargada la muestra en la columna, ésta se lava con 30 ml del tampón de equilibrio y se aplica un gradiente lineal formado por: Tris-HCl 20 mM pH: 7.5, conteniendo 2 mercaptoetanol 1 mM, NaCl 0.8 M.

El volumen del gradiente es de 100 ml, el flujo de elución es de 1.5 ml/min y se recogen fracciones de 4 ml. Las fracciones con actividad de adenilato ciclase se combinan, constituyendo lo que se denominará preparación Azul-Sepharosa II.

#### VII.4. ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis preparativa se realizó en un equipo "Prep-Disc" de Canalsco, provisto de una columna Pd-2/70, según los detalles siguientes:

- Preparación del gel inferior: se parte de las siguientes soluciones:

Solución A. 36.3 g de Tris, 230  $\mu$ l TEMED (N,N,N', N'-tetrametil-etilen-diamina), 48 ml de HCl 1N llevada a un volumen final de 100 ml con agua destilada.

Solución B. 20 g de acrilamida y 0.48 mg de N,N'-metilen-tetra-

CAPITULO	II	PAGINA	114	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

acrilamida, llevada a un volumen final de 100 ml con agua destilada. La solución se filtra sobre papel Whatman nº 1.

Solución C. 28 mg de persulfato amónico en 20 ml de agua destilada.

El gel inferior es del 5 % de acrilamida. Para su formación se mezclan en proporción 1:2:1:4 (v/v/v/v ) las soluciones A/B/agua destilada /C.

La mezcla desgasificada a vacío en baño de hielo, se introduce en el tubo correspondiente del aparato, tapado por el extremo inferior, y se cubre con una pequeña capa de agua para evitar la formación de menisco. La polimerización se realiza a 4º C y tiene lugar en aproximadamente 45 minutos. Finalizada ésta, se extrae el agua que cubría el gel y se procede a la formación del gel superior.

- Preparación del gel superior: se parte de las siguientes soluciones:

Solución D. 1.1 g de Tris; 100 µl de TEMED (N,N,N', N'-tetrametil-etilen-diamina) 9.6 ml de HCl 1N, llevada a un volumen final de 20 ml con agua destilada.

Solución E. 2.8 g de acrilamida, 50 mg de N, N'-metilen-bis-acrilamida, llevada a un volumen final de 20 ml con agua destilada.

Para la formación del gel superior (3.5 % de acrilamida) se mezclan en proporción 1:2:1:4 (v/v/v/v ) las soluciones D/E/agua destilada/C. La mezcla desgasificada a vacío en baño de hielo se introduce con pipeta Pasteur sobre el gel inferior, y se cubre con una pequeña capa de agua para evitar la formación de menisco. La polimerización se realiza a 4º C. Finalizada ésta se extrae el agua que cubría el gel.

Preparación de la muestra y electroforesis:

La preparación Azul sepharosa I (25 ml) se dializa durante 18-20 horas a 4º C frente a 20 volúmenes de Tris-glicina 30 mM pH: 8.2

CAPITULO	II	PAGINA	115	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

conteniendo glicerol 5 % (v/v). La muestra se concentra por ultrafiltración, usando una membrana AMICON PM 30, hasta un volumen final de 1 ml.

Las cámaras superior e inferior del aparato de electroforesis - donde se alojan los electrodos, se llenan con Tris-glicina 30 mM pH 8.2. El tampón de elución es Tris-HCl 0.37M pH 8.4 conteniendo glicerol 5 % (v/v). La velocidad de elución es de 15 ml/h y se recogen fracciones de 2 ml.

Antes de aplicar la muestra, se hace circular una intensidad de 5 mA durante 1-2 horas a 4° C. Después de este tiempo se aplica la muestra (0.5 mg proteína) y se efectúa la electroforesis -- igualmente a 4° C, aplicando una intensidad constante de 10 mA. La duración del proceso es de 5-6 horas. Los tubos con actividad de adenilato ciclasa se combinan constituyendo la preparación electroforesis preparativa.

## VIII. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA

### VIII,1. ELECTROENFOQUE EN GRADIENTE DE SACAROSA

Se utilizó la columna marca LKB de 110 ml de capacidad. El electroenfoque se realiza siguiendo las instrucciones del manual de uso proporcionado por LKB.

#### Procedimiento:

- Llenado de la columna y aplicación de la muestra:

Inicialmente se introduce la solución densa de electrodo, compuesta por 4 ml de  $H_3PO_4$  1 M, 15 g de sacarosa, 12 ml de agua destilada. A continuación se introduce un gradiente lineal de -



CAPITULO	II	PAGINA	116	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

sacarosa, del 50 % al 5 %, formado por:

. solución densa: 27 g de sacarosa, 36 ml de agua destilada y 2 ml de Ampholine (intervalo de pH 4.6) al 40 % (P/v).

. solución ligera: 2.7 g, 52.3 ml de agua destilada y 0.7 ml de Ampholine (intervalo de pH 4-6) al 40 % (P/v).

La concentración de Ampholine en el gradiente ya formado es del uno por ciento. El gradiente se introduce en la columna por medio de una bomba peristáltica modelo LKB a un flujo constante - de 1.4 ml/min.

Por último, se introduce la solución ligera de electrodo compuesta por 10 ml de Na OH 0.25 M.

Primeramente se realiza un electroenfoque de los anfolitos durante 20 h a 4 ° C, con una intensidad de corriente inicial de 7 mA y un voltaje de 700 V.

A continuación, se extrajo del centro de la columna un volumen - del contenido igual al volumen de la muestra a sembrar (aproximadamente 1 ml, conteniendo entre 2 y 5 mg de proteína). Se ajustó la concentración de la muestra (preparación Bio-Gel) por el - agregado de sacarosa sólida y se la introdujo en el medio del - gradiente con la ayuda de una bomba peristáltica, modelo LKB. El electroenfoque de la muestra se realiza en las mismas condiciones durante 48 h. La intensidad y el voltaje final fueron 2 mA y 1800 V, respectivamente.

Finalizado el electroenfoque, se extrae en primer lugar la solución ligera de electrodo. Posteriormente, se eluye la columna, introduciendo con bomba peristáltica y a presión constante, agua destilada por la parte superior. El flujo de vaciado es de 2 ml /min y se recogen fracciones de 2 ml. El pH de las fracciones - se mide a 4° C con el pH-metro calibrado a dicha temperatura. Finalmente, se neutralizan las fracciones y se mide actividad del adenilato ciclasa.

CAPITULO	II	PAGINA	117	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

### VIII,2 ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA

Se prepara gradientes de 5 a 20 % (P/v) de sacarosa, hechos en - agua destilada u óxido de deuterio ( $D_2O$ ), conteniendo Tris-HCl - 50 mM pH: 7.4, 2-mercaptoetanol 1 mM, EDTA 0.5 mM y NaCl 0.15 M.

Los gradientes se forman en tubos de acetato de celulosa 5x1.2 - cm, correspondientes al rotor Beckman SW 56. Sobre el gradiente formado se aplican 0.3 ml de una mezcla que contiene 0.5 mg de - proteína correspondiente a la preparación Hexilamino-sepharosa y las siguientes proteínas marcadoras: malato deshidrogenasa (co- razón porcino) 0.01 mg/ml; lactato deshidrogenasa (músculo de co- nejo) 0.03 mg/ml y citocromo c (corazón de caballo) 2 mg/ml.

Las centrifugaciones se realizan a 45000 rpm durante 16 horas a 2° C. Finalizada la centrifugación, se extrae el gradiente de - los tubos con bomba peristáltica, comenzando por el fondo y avi- tando al máximo su distorsión. Se recogen fracciones de 0.2 ml con un flujo de 1 ml/min.

Posteriormente se procede a la detección de las proteínas utili- zadas como marcadores (apartado VIII,4 de esta sección de "Mate- riales y Métodos") y de la actividad de adenilato ciclasa.

### VIII,3 FILTRACION EN GELES DE AGAROSA

La determinación del radio de Stokes ( $a$ ) de la adenilato ciclasa se llevó a cabo en una columna de Bio-Gel A-5 m, con un lecho de gel de 85 x 0.9 cm.

A la columna se aplica 1 ml de la preparación exilamino-sacarosa (15-20 mg de proteína), conteniendo las siguientes proteínas mar- cadoras: galactosidasa (E. coli) 0.05 mg/ml, catalasa (hígado bo- vino) 0.1 mg/ml; malato deshidrogenasa (corazón porcino) 0.01 mg /ml; lactato deshidrogenasa (músculo de conejo) 0.03 mg/ml y ci-

CAPITULO	II	PAGINA	118	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

tocromo c (corazón de caballo) 2 mg/ml. El volumen de exclusión se determina usando una suspensión de *Rhizobium meliloti* conteniendo  $6 \times 10^8$  bacterias/ml, siguiendo la absorbancia a 660 nm.

#### VIII,4 DETERMINACION DE LA POSICION DE LAS PROTEINAS MARCADORAS EN LOS GRADIENTES DE SACAROSA Y EN LAS COLUMNAS DE BIO - GEL

. citocromo c. Su detección se lleva a cabo por medida de la absorción a 410 nm.

. malato deshidrogenasa. La actividad se mide por el consumo de NADH, en presencia de oxalacetato, siguiendo la desaparición de su absorbancia a 340 nm (277).

. lactato deshidrogenasa. Se mide su actividad por el consumo de NADH, en presencia de piruvato, siguiendo la desaparición de su absorbancia a 340 nm (277).

. catalasa. La actividad se mide siguiendo la desaparición de  $H_2O_2$ , por la conversión de yoduro a yodo, según el método de Terenzi et al. (278).

.  $\beta$ galactosidasa. La actividad se mide usando O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranoóxido como sustrato (277).

#### IX. CALCULO DE LOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS Y MOLECULARES

CAPITULO	II	PAGINA	119	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

#### IX,1 VOLUMEN ESPECIFICO PARCIAL

El método usado fué desarrollado Clarke (279) y Meunier et al - (280) para determinar el volumen específico parcial de complejos de proteínas y detergentes, mediante el análisis de los coefi - cientes de sedimentación en gradientes de densidad hechos en H<sub>2</sub>O o D<sub>2</sub>O. El principio del método ha sido descrito por Edelstein y Schachman (281), y se basa en el cambio en el coeficiente de sedimentación producido por el aumento de densidad de la solución por el uso de D<sub>2</sub>O.

De acuerdo con el trabajo de Martín y Ames (282), el  $\bar{v}$  de la adenilato ciclasa se calculó según la siguiente ecuación:

$$\bar{v} = \frac{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} - 1}{\frac{S_H \eta_D}{S_D \eta_D} \int_D - \int_H}$$

Donde  $S_H$  y  $S_D$  son los coeficientes de sedimentación aparentes de terminados experimentalmente en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O, respectivamente y  $\eta_H$   $\eta_D$  son las viscosidades de las soluciones en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O respectivamente, en la zona en que se sitúa la macromolécula analizada.

$S_H$  y  $S_D$  son los datos obtenidos a partir de la representación - del coeficiente de sedimentación de las proteínas marcadoras en función de la distancia recorrida en los gradientes de H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O.

El cociente  $\eta_H/\eta_D$  se determina a partir de la viscosidad relativa de la zona en que se sitúa la proteína marcadora en los gradientes de H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O en función de la distancia recorrida. Las densidades  $\int_D$  y  $\int_H$  se determinan por gravimetría utilizando una micropipeta de 50  $\mu$ l.

CAPITULO	II	PAGINA	120	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

## IX,2 RADIO DE STOKES

El valor del radio de Stokes ( $a$ ) de la adenilato ciclasa se obtiene a partir del perfil de elución de la actividad enzimática en las columnas de Bio-Gel A 5 m. Se representan el volumen de elución normalizado ( $v_e/v_o$ ) para todas las proteínas marcadoras, de parámetros moleculares conocidos frente al radio de Stokes, - donde  $v_e$  es el volumen de elución de cada proteína y  $v_o$  el volumen de exclusión de la columna. De esta forma se obtiene la recta de calibrado de la columna. Se lleva a ella el valor de  $v_e/v_o$  obtenido para la adenilato ciclasa, obteniéndose así el radio de Stokes de la enzima.

## IX, 3 PESO MOLECULAR

El peso molecular de la adenilato ciclasa se calcula de acuerdo a la ecuación de Siegel y Monty (283):

$$M = \frac{6 \pi N \eta_{20.W}}{1 - \bar{v} \rho_{20.W}} \cdot a \cdot s_{20.W}$$

Donde  $N$  es el número de Avogadro,  $\eta_{20.W}$  es la viscosidad del agua a 20° C ( $1,100 \cdot 10^2$  g/cm.seg),  $a$  es el radio de Stokes,  $s_{20.W}$  es el coeficiente de sedimentación,  $\bar{v}$  es el volumen específico parcial y  $\rho_{20.W}$  es la densidad del agua a 20° C ( $0.988$  cm<sup>3</sup>/g).

CAPITULO	II	PAGINA	121	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

#### IX,4 RAZON FRICCIONAL

La razón friccional se calcula usando los parámetros moleculares previamente obtenidos ( $\bar{v}$ ,  $a$ ,  $M$ ), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f/f_0 : a \left( \frac{4\pi N}{3 M \bar{v}} \right)^{1/3}$$

siendo  $f$  el coeficiente de fricción de la proteína y  $f_0$  el coeficiente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

#### XI,5 PARAMETROS DE LAS PROTEINAS MARCADORAS

En la tabla V, se resumen los parámetros moleculares de las proteínas marcadoras usadas en las centrifugaciones, en gradientes de sacarosa y en las filtraciones en gel. La tabla fué confeccionada en base a los datos reunidos por Haga et al (34).

#### X. ELECTROFORESIS ANALITICA EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA

El método utilizado es básicamente el descrito por Laemmli (284) Se realizan geles planos polimerizados en una célula marca Bio - Rad, modelo 270.

-- Preparación y características del gel inferior:

CAPITULO	II	PAGINA	122	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

PROTEINA	COEFICIENTE	VOLUMEN	RADIO DE STOKES a	PESO MOLECULAR PM
	DE	ESPECIFICO		
	SEDIMENTACION $S_{20,W}$ (S)	PARCIAL $\bar{v}$ (ml/g)		
$\beta$ Galactosidasa	15.9	0.76	6.84	520000
Catalasa	11.3	0.73	5.21	247000
Lactato Deshidrogenasa	7.3	0.74	4.75	142000
Malato Deshidrogenasa	4.3	0.74	3.69	70000
Citocromo C	1.7	0.73	1.87	13300

Tabla V. Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadoras utilizadas.

CAPITULO	II	PAGINA	123	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

Las dimensiones del gel inferior son: 8 cm de alto y 1.5 mm de espesor. Se parte de la siguiente solución: 10 ml de acrilamida 30 % (p/v), 8 mg de N,N'-metilen-bisacrilamida, 0.3 ml de SDS 10 % (p/v), 11.3 ml de Tris-HCl 1M pH: 8.8 y 10.8 ml de agua destilada.

Una vez desgasificada la mezcla a vacío, en baño de hielo, se añaden 7.5  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina) y 0.1 ml de persulfato de amonio 10 % (p/v) y se vierte en la cámara correspondiente de la celda de electroforesis. La polimerización tiene lugar en 20-30 minutos a temperatura ambiente, siendo la concentración final de acrilamida del 10 %. Finalizada ésta, se cubre el gel y se procede a la formación del gel superior.

-- Preparación y características del gel superior:

Las dimensiones del gel superior son: 1.5 centímetro de alto y 1.5 mm de espesor.

Se parte de la siguiente solución: 1.66 ml de acrilamida 30 % (p/v), 13 mg de N,N'-metilen-bisacrilamida, 0.1 ml de SDS 10 % (p/v), 1.25 ml de Tris-ClH 1 M pH 6.8 y 7.55 ml de agua destilada. Una vez desgasificada la mezcla a vacío en baño de hielo se añaden 5  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina) y 0.1 ml de persulfato de amonio 10 % (p/v). A continuación se vierte en la celda de electroforesis y se coloca un peine especial que después de la polimerización del gel se retira y quedan formados los canales en los que se aplicarán las muestras posteriormente.

-- Preparación de la muestra y electroforesis:

Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se dializan durante 16 horas a 4° C frente a Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y posteriormente se liofilizan. Seguidamente se resuspenden en 50-75  $\mu$ l de una solución desnaturalizante de la siguiente composición: SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol, 5 % (v/v), glicerol 20 % (v/v) Tris-HCl 60 mM pH 6.8 y Azul de bromofenol 0.002 % (p/v). Las muestras se calientan durante tres minutos en baño de agua a 100 ° C . El contenido de proteína en cada canal sembrado es de 10-



CAPITULO	II	PAGINA	124	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

100 g. El tampón de electroforesis es: Tris-glicina 50 mM pH - 8.0 conteniendo SDS 0.1 % (p/v). La electroforesis se realiza a una intensidad de corriente constante de 20 mA durante 6-7 horas manteniendo la temperatura en 15° C. Las proteínas para la confección de la recta de calibrado de los pesos moleculares son: fosforilasa b (músculo de conejo), albúmina (suero bovino), ovoal búmina ( clara de huevo), anhidrasa carbónica (eritrocitos bovi - nos) e inhibidor de tripsina (soja).

#### X,1 LOCALIZACION DE PROTEINAS

Se han seguido dos métodos:

a) Tinción con azul de Coomassie: los geles se fijan y tiñen al mismo tiempo, durante 2-6 horas a 37° C en una solución acuosa - que contiene metanol 25 % (v/v), ácido acético 8 % (v/v) y azul de Coomassie G o R 250 0.2 % (p/v). El desteñido se efectúa con la misma solución sin colorante.

b) Tinción con Ag NO<sub>3</sub>: Esta tinción se efectuó por el método - de Oakley (285).

El procedimiento es como sigue: se deja el gel en una solución de glutaraldehído 10 % (v/v) durante 30 minutos. A continuación se lava extensivamente con agua destilada durante 6-7 horas, seguidamente se mantiene el gel durante 10-15 minutos en una solución formada por: 1.4 ml de NH<sub>4</sub> OH 0.36 % (p/v) y 75 ml de agua destilada a la que, lentamente, y con agitación, se añaden 4 ml de Ag NO<sub>3</sub> 20 % (p/v). Se lava el gel con agua destilada durante 2-3 minutos y se transfiere a un recipiente que contiene una solución recién preparada de ácido cítrico 0.005 % (p/v) y formaldehído 0.019 % (hecho por dilución de una solución comercial de formaldehído de 38 %). Las proteínas teñidas se hacen visi - bles en esta etapa. Finalmente; se lava el gel con agua destila

CAPITULO	II	PAGINA	125	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

da, durante 2-4 horas.

## X.2 LOCALIZACION DE ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA

Una vez concluida la electroforesis se deja el gel durante 30 minutos en una solución acuosa que contiene metanol 10 % (v/v) y ácido propiónico 10 % (v/v). A continuación, el canal donde se quiere localizar actividad enzimática se corta longitudinalmente para separarlo del resto del gel y se realizan cortes transversales de 2-3 mm, cada porción del gel se introduce en un tubo de ensayo, conteniendo 1 ml de una solución acuosa de ácido propiónico 10 % (v/v) y en el interior del tubo se trocea con ayuda de una varilla de vidrio. Las suspensiones así formadas se dializan frente a una solución acuosa de ácido propiónico 5 % (v/v) (286) durante 7-8 horas a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se dializa nuevamente frente a una solución de cloruro de guanidinio 6M durante 7-8 horas, y finalmente se dializa extensivamente frente a Tris-ClH 10 mM pH 7.4 (287). A continuación las muestras se centrifugan a baja velocidad en una centrífuga clínica y los sobrenadantes se liofilizan.

Seguidamente, las muestras se resuspenden en 100  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, conteniendo NaCl 200 mM, ditiotreitól 1 mM y glicerol 10 % (v/v) y se deja durante 2-3 horas a 4° C. Finalmente se le agrega 100  $\mu$ l de la mezcla de incubación conteniendo Mn - Cl<sub>2</sub> 2mM y [<sup>32</sup>P] ATP 0.5 mM de una actividad específica entre 1000-2000 cpm por pmol, para medir actividad de adenilatociclasa (apartado V de esta sección de "Materiales y Métodos"), y se deja incubando durante 7-8 horas a 4° C y a continuación 30 minutos a 37° C. Finalizado ese tiempo se agregan 200  $\mu$ l de la mezcla de detención de la reacción y se precede tal como se especifica en el apartado V.

CAPITULO II	PAGINA 126	MATERIALES Y METODOS
-------------	------------	----------------------

# XI. PREPARACION DE ADENILATO CICLASA SOLUBLE DE TESTICULO DE RATA

Se utilizaron ratas macho Wistar, de 45 a 90 días de edad, con un peso promedio entre 200 y 250 g.

Los animales se sacrifican por decapitación. Luego se extraen los testículos e inmediatamente se practica una incisión en la superficie del testículo, depositando los túbulos seminíferos en un vaso de precipitados sumergido en baño de hielo y eliminando la túnica vaginal. El material se homogeneiza en tres volúmenes de tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM y EDTA 0.5 mM, usando un equipo Ultra-Turrax (desintegrador de tejidos modelo T 18-10 IKA). Esta operación y las siguientes se realizan a 4º C. El extracto se centrifuga a 7700 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se somete a ultracentrifugación a 105000 xg durante 60 minutos. Este último sobrenadante se aplica a una columna de DEAE celulosa, con un lecho de resina de 2.5 x 14 cm, previamente equilibrada con el tampón de homogeneización. Una vez pasada la muestra se lava con 400 ml del mismo tampón de equilibrado y se aplica un gradiente lineal formado por tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM, EDTA 0.5 mM y tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM, EDTA 0.5 mM, NaCl 0.7 M. El volumen total del gradiente es de 600 ml, el flujo de elución es de 1.7 ml/min, y se recogen fracciones de 10 ml.

La actividad de adenilato ciclasa eluyó como un único pico a una concentración de 0.25-0.30 M de NaCl. Las fracciones correspondientes se dializaron durante 17-20 horas a 4º C frente a 20 volúmenes de tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM, y se guardaron posteriormente a -20º C.

CAPITULO	II	PAGINA	127	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

## XII. PREPARACION DE MEMBRANAS DE ERITROCITO DE PAVO

Para la preparación de membranas de eritrocito de pavo, se sigue el siguiente procedimiento:

La sangre heparinizada se centrifuga a 120 xg durante 10 minutos a continuación las células sedimentadas se lavan cuatro veces - con un volumen de una solución fría de Tris-HCl 1mM pH 7.4, conteniendo NaCl 0.15 M y Mg Cl<sub>2</sub> 0.1 mM. Las células se resuspenden en dos volúmenes de agua destilada fría y se homogeneizan en un Potter, manteniendo el extracto a 4° C. Seguidamente se añade al lisado Deoxiribonucleasa I (40 µg/ml) y la mezcla se incuba durante 20 minutos a 30 ° C. Finalmente, la mezcla se centrifuga a 25000 xg durante 30 minutos a 4 ° C y las membranas sedimentadas se resuspenden en tampón A conteniendo ditiotreitól 1 - mM y se mantiene a - 20° C.

### XII,1 TRATAMIENTO CON TOXINA DEL COLERA

El tratamiento de las membranas de eritrocito con toxina del cólera se efectúa de la siguiente forma: la mezcla de reacción - contiene Hepes (N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2 ácido etanosulfónico) 20 mM pH 8 (tampón B) conteniendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, ditiotreitól 1 mM, NAD 1 mM, ATP 1 mM, GTP 10 µM, toxina del cólera 10 µg/ml (pretratada con ditiotreitól 20 mM a 37 ° C durante 20 minutos) y membranas de eritrocito (16mg proteína/ml). El volumen total es de 2 ml. La incubación se realiza a 37° C durante 30 minutos y la reacción se detiene por el agregado de 8 ml de tampón A - frío. A continuación, la mezcla se centrifuga a 105000 xg durante 60 minutos y las membranas se resuspenden en tampón B, conteniendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM.

Como control se trataron membranas en las mismas condiciones pe-

CAPITULO	II	PAGINA	128	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

ro omitiendo la toxina.

Para el marcado radiactivo de las membranas por ATP ribosilación (apartado VII, Introducción) se usó el mismo tratamiento con toxina del cólera, agregando al medio de incubación 1  $\mu$ l de [ $^{14}\text{C}$ ] NAD (5  $\mu$ ci/ml), y lavando las membranas dos veces con  $\text{Na CO}_3\text{H}$  - 1 mM antes de la resuspensión final.

#### XII,2 TRATAMIENTO CON DETERGENTE

Las membranas de eritrocito pretratadas o no con toxina del cólera se resuspenden en tampón B conteniendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM (5mg proteína/ml). La suspensión se mantiene a 0° C con agitación magnética y se añade lentamente colato de sodio sólido hasta una concentración final de 25 mM, continuando la agitación durante 60 minutos. Finalizado este tiempo, la mezcla se centrifuga a 20000 xg durante 60 minutos a 4° C. Seguidamente, el sobrenadante obtenido se incuba a 23° C durante 20 minutos para inactivar la actividad adenilato ciclasa.

Alternativamente, las membranas se tratan con digitonina 1 % (p/v) siguiendo el mismo procedimiento, excepto que la incubación a 23° C no es necesaria.

#### XII,3 CROMATOGRAFIA EN ULTROGEL

Las membranas de eritrocito se marcan con toxina del cólera y [ $^{14}\text{C}$ ] NAD, tal como se especifica en el apartado XII,1 de este capítulo de "Materiales y Métodos", y a continuación se tratan con digitonina 1 % (p/v). El sobrenadante obtenido después de centrifugar a 20000 xg durante 1 hora a 4° C se siembra (1 ml, 5-

CAPITULO	II	PAGINA	129	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

7 mg proteína) en una columna de Ultrogel Aca 34 (intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares 20000-400000) con un lecho de gel de 53 x 1.25 cm y equilibrada con Tris-HCl 15 mM pH 7.4 medido a 4° C, conteniendo EDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, digitonina 0.1 %. La elución se realiza a 4° C con el mismo tampón de equilibrado, a un flujo de 0.8 ml/min, recogiendo fracciones de 4 ml.

Por una parte se tomaron 500 µl de cada fracción para lectura de <sup>14</sup>C, y se midieron en un contador Beckman modelo LS8100, con el programa 3 del mismo. Por otra parte, se tomaron 30 µl de cada fracción y se mezclaron con 5 µl de una suspensión de membranas de Neurospora crassa (12 mg de proteína/ml) y se efectuó el tratamiento de reconstitución tal como se especifica en el apartado XIII de este capítulo de "Materiales y Métodos".

#### XIII. PROCEDIMIENTO PARA LA RECONSTITUCION DE LA ADENILATO CICLASE EMPLEANDO COMPONENTES DE DISTINTOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Los experimentos de reconstitución de la adenilato ciclasa se realizaron de la siguiente forma: una cantidad determinada de membranas de la cepa salvaje (StL74) de Neurospora crassa preparada por resuspensión del P<sub>105</sub> (apartado II de "Materiales y Métodos") en tampón A conteniendo ditiotreitol 1 mM (12 mg de proteína/ml) se mezclan con una cantidad determinada del extracto en detergente de las membranas de eritrocito de pavo (2.5 mg de proteína/ml) (apartado XII, 2 de "Materiales y Métodos"). Se llevan las mezclas a un volumen final de 50 µl con tampón A conteniendo ditiotreitol 1 mM y se incuban a 23° C durante 20 minutos a continuación se ensaya la actividad de adenilato ciclasa.

Se realizaron además experimentos de reconstitución en las mis

CAPITULO	II	PAGINA	130	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

mas condiciones, usando el lugar de membranas de la cepa salvaje de Neurospora crassa, las correspondientes a la cepa FGSC 488, - portadora de la mutación cr-1 (apartado XVI, 4 Introducción). Esta cepa se cultiva y homogeneiza de la misma forma que se hace - con la cepa salvaje, efectuándose, igualmente, su fraccionamiento, tal como se especifica en los apartados I y II de este capítulo de "Materiales y Métodos".

Los experimentos de reconstitución, empleando en lugar de membranas de Neurospora crassa, preparaciones solubles de adenilato ciclasa, se efectúan en las mismas condiciones que con los preparados de membrana, y se realizaron con una preparación soluble de adenilato ciclasa de testículo de rata, obtenida, según se especifica, en el apartado XI de "Materiales y Métodos" y con la preparación hexilamino-sepharosa de Neurospora crassa, obtenida, tal como se especifica en el apartado VII, 1 de "Materiales y Métodos".

#### XIV. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA

La actividad de fosfodiesterasa de cAMP se mide básicamente según el procedimiento descrito por Thompson y Appleman (288). La mezcla de incubación está compuesta por: Tris HCl 40 mM pH 8, Mg Cl<sub>2</sub> 5 mM, cAMP 200  $\mu$ m y [<sup>3</sup>H] cAMP (50-70000 cpm), el volumen final es de 100  $\mu$ l. La mezcla se incuba durante 5-10 minutos a 30 °C y la reacción se detiene por calentamiento en baño de agua a 100° C durante 2 minutos. A continuación la mezcla se incuba nuevamente con el agregado de 40  $\mu$ l de veneno de serpiente (King cobra, 2 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 8). Esta segunda reacción se detiene añadiendo la mezcla 20  $\mu$ l de una solución conteniendo EDTA 50 mM y adenosina 5 mM.

— A continuación se agrega 1 ml de una suspensión que contiene 1ml

CAPITULO	II	PAGINA	131	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

de una suspensión que contiene un volumen de resina de intercambio iónico AG 1-X<sub>4</sub> (200-400 mesh) y tres volúmenes de etanol 30% (v/v) en agua destilada, y se deja sedimentar la resina durante 15 minutos. Finalmente se toman alícuotas de 0.5 ml de los sobrenadantes y se agregan a tubos plásticos conteniendo la mezcla de centelleo, compuesta por Omnioflúor 0.4 % (p/v) y Tritón X100 30 % (v/v) en tolueno.

La radiactividad se midió en un contador de centelleo Beckman, - usando el programa 1 del mismo con lectura para <sup>3</sup>H.

#### XV. PREPARACION DE FOSFODIESTERASA DE CEREBRO DE VACA

Se parte de un cerebro de vaca de 300-350 g, se trocea y homogeneiza en Tris-HCl 30 mM pH 7.4, conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM EDTA 0.5 mM, PMSF 1 mM (400 ml). Para ello se empleó un equipo Ultra-Turrax (desintegrador de tejidos modelo T18-10 IKA). La homogeneización y los demás procesos de la preparación enzimática se efectúan a 4° C. Seguidamente, el extracto se centrifuga a 25000 xg durante 10 minutos y sobrenadante obtenido se centrifuga nuevamente a 105000 xg durante 60 minutos.

El sobrenadante obtenido de esta última centrifugación se aplica a una columna de DAE-celulosa DE52, con un lecho de resina de 50 x3cm, previamente equilibrada con Tris-HCl 30 mM pH 7.4, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. Una vez pasada la muestra, se lavó con 500 ml de tampón de equilibrado y se aplicón un gradiente lineal formado por Tris-HCl 30 mM pH 7.4 conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y Tris-HCl 30 mM pH 7.4 conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM, NaCl 0.8 M. El volumen total del gradiente es de 600 ml, el flujo de elución es de 1.5 ml/min y se recogen fracciones -



CAPITULO	II	PAGINA	132	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

de 10 ml. Las fracciones con actividad de fosfodiesterasa de cAMP se combinan y dializan durante 17-20 horas frente a Tris-HCl 30 mM pH 7.4, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM.

#### XVI. ENSAYO DE CALMODULINA

El ensayo de calmodulina se realiza midiendo la activación producida sobre la actividad de fosfodiesterasa de cAMP.

La mezcla de incubación está compuesta por: Tris-HCl 40 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M, albúmina (0.1 mg/ml), cAMP 200  $\mu$ M, [<sup>3</sup>H] cAMP (50-70000 cpm) y preparación de fosfodiesterasa de cerebro (2 Mg de proteína/ml), obtenida tal como se especifica en el apartado XV de "Materiales y Métodos". El volumen final es de 0.1 ml y la medición de la actividad de fosfodiesterasa de cAMP se realiza tal como se especifica en el apartado XIV de este capítulo de "Materiales y Métodos".

#### XVII. PURIFICACION DE CALMODULINA DE NEUROSPORA CRASSA

Se parte de 22 g de micelio seco, obtenido tal como se especifica en el apartado I de "Materiales y Métodos", y se homogeneizan primeramente en presencia de nitrógeno líquido y posteriormente en 200 ml de Tris-HCl 30 mM pH 7.4, conteniendo EDTA 0.5 mM y llegándose a obtener la fracción soluble del micelio S<sub>105</sub> (175ml) tal como se especifica en el apartado II de este capítulo de "Materiales y Métodos".

CAPITULO	II	PAGINA	133	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

#### XVII,1 CROMOTOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

La fracción S<sub>105</sub> se aplica a una columna de DEAE-celulosa DE52, con un lecho de resina de 30 x3 cm y equilibrada con Tris-HCl 30 mM pH 7.4, medido a 4° C. Después de cargar la muestra en la columna, se lava con 300 ml del tampón de equilibrado, conteniendo NaCl 0.1 M y se aplica un gradiente lineal formado por: Tris-HCl 30 mM pH 7.4, conteniendo NaCl 0.1 M y Tris- HCl 30 mM pH 7.4 - conteniendo NaCl 0.7 M. El volumen total del gradiente es de 500 ml, el flujo de elución es de 1.5 ml/min, y se recogen fracciones de 10 ml. La cromatografía se efectúa a 4° C. Las fracciones en las que se detecta la presencia de calmodulina se combinan y se calientan en baño de agua a 100° C durante 5 minutos. Seguidamente, la muestra se centrifuga a 12000xg durante 15 minutos. El sobrenadante correspondiente se dializa frente a 20 volúmenes de agua destilada durante 15-18 horas a 4° C, constituyendo la preparación de DEAE-celulosa.

#### XVII,2 CROMATOGRAFIA EN HIDROXILAPATITO

La preparación de DEAE-celulosa (90 ml) se aplica a una columna de hidroxilapatito con un lecho de resina de 20 x2.5 cm, y equilibrada con tampón fosfato sódico 5 mM pH 7.2, una vez pasada la muestra, la columna se lava con 100 ml del tampón de equilibrado y se aplica un gradiente lineal formado por tampón fosfato sódico 5 mM pH 7.2 y tampón fosfato sódico 200 mM pH 7.2, el volumen total del gradiente es de 200 ml, el flujo de elución es de 0.5 ml/min y se recogen fracciones de 7 ml. Las fracciones donde se detecta la presencia de calmodulina se dializan extensivamente frente a agua destilada y se liofilizan. El liofilizado constituye lo que se denominará preparación hidroxilapatito.

CAPITULO	II	PAGINA	134	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

#### XVII, 3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

La cromatografía de afinidad se efectúa en 2-cloro-10(3-aminopropil) fenitiazina-sepharosa 4 B (CAPP)-sepharosa 4 B (289)(figura 20). El método de preparación de la resina es igual al descrito en el apartado VI de "Materiales y Métodos", cambiando exclusivamente el derivado a acoplar a la sepharosa, empleándose en este caso clorhidrato de 2-cloro-10-(3-aminopropil)fenotiazina (figura 20). El liofilizado correspondiente a la preparación hidroxilapatito se resuspende en 10 mM de Tris-HCl 20 mM pH 7.4, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM  $\text{CaCl}_2$  1 mM, NaCl 200 mM y se aplica a una columna de CAPP-sepharosa, cubierta en todo su largo con "papel aluminio" para evitar la luz, con un lecho de resina de 20 x 2 cm. Una vez pasada la muestra se lava con Tris-HCl 20 mM pH 7.4 conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y NaCl 200 mM. El flujo de elución es de 0.5 ml/min y se recogen fracciones de 2 ml, detectando la presencia de proteína por absorción a 280 nm, una vez que cesa la elución de proteína se lava la columna con Tris-HCl 20 mM pH 7.4 conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM NaCl 200 mM, EGTA 10 mM para eluir la calmodulina, y se recogen fracciones de 2 ml al mismo flujo de elución.

Las fracciones en las que se detecta la presencia de calmodulina se combinan y se dializan extensivamente frente a agua destilada a continuación la muestra se liofiliza. Finalmente se la resuspende en 0.2-0.5 ml de agua destilada, constituyendo lo que se denominará preparación CAPP-sepharosa.

#### XVII,4 FILTRACION EN GEL

0.4 ml de la preparación CAPP-sepharosa o alternativamente de la preparación hidroxilapatito se aplican a una columna de Bio Gel P60 (intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares 3000

CAPITULO	II	PAGINA	135	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

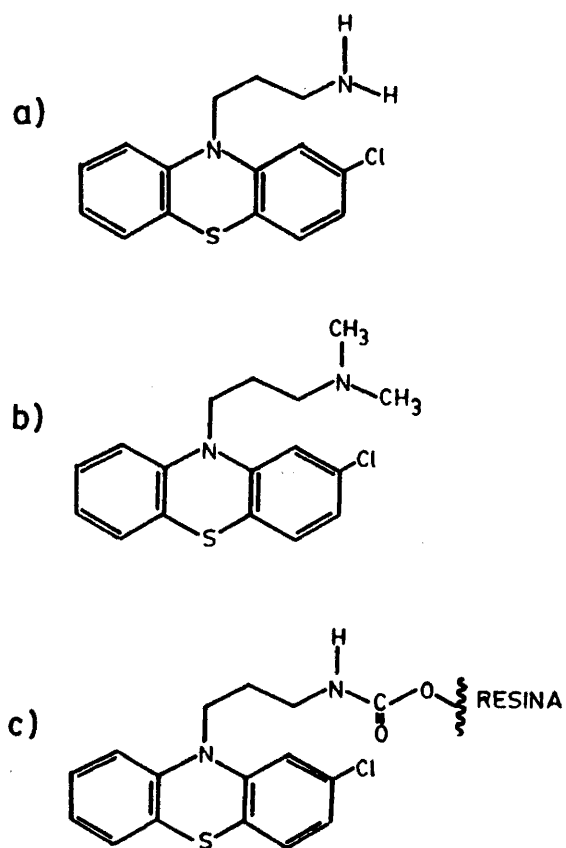


Figura 20. Estructura química de: a) 2-cloro-10-(3-aminopropil) fenotiazina. b) Clorpromazina. c) Conjugado de 2-cloro-10-(3 aminopropil) fenotiazina-sepharosa (CAPP-sepharosa).

CAPITULO	II	PAGINA	136	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

-60000) con un lecho de resina de 60 x1.5 cm, previamente equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 7.4, el flujo de elución es de 0.3 ml/min y se recogen fracciones de 1 ml. Las fracciones en las que se detecta la presencia de calmodulina se combinan y se dializan extensivamente frente a agua bidestilada a 4° C. A continuación se liofiliza la muestra y se resuspende en el mismo volumen de agua bidestilada (0.1-0.3 ml).

#### XVIII. PURIFICACION DE CALMODULINA DE CEREBRO DE VACA

Se parte de 200 g de cerebro de vaca, se trocea, homogeneiza y fracciona tal como se especifica en el apartado XV de "Materiales y Métodos", llegando, finalmente, al sobrenadante de la última centrifugación realizada a 105000 xg durante 60 minutos.

La purificación de calmodulina se realiza partiendo de este sobrenadante y se procede de la misma forma que se especifica para la purificación de calmodulina de Neurospora crassa (apartado XV II de "Materiales y Métodos").

#### XIX. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA ADENILATO CICLASE DE NEUROSPORA CRASSA

##### XIX,1 PROCEDIMIENTO DE INMUNIZACION

Se emplean ratones BALB/c de seis semanas de edad. Los ratones reciben por inyección intraperitoneal 50 µl de una preparación -

ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA
--

CAPITULO	II	PAGINA	137	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

de adenilato ciclasa de Neurospora crassa (100 µg de proteína, - actividad específica 45 nmol/min/mg proteína) purificada hasta la etapa azul-sepharosa I (apartado VII,3 de "Materiales y Métodos") mezclada con 50 µl de adyuvante completo de Freund. A la semana, se aplica nuevamente por inyección intraperitoneal 100 - µl de la misma preparación enzimática sin adyuvante. Cuatro - días después los animales se sacrifican para efectuar la fusión.

#### XIX,2 PROCEDIMIENTO DE FUSION Y CULTIVO

Los ratones se sacrifican por dislocación cervical y se introducen en una solución de desinfectante. Se saca el bazo y se lo coloca en una placa de Petri con 10 ml de medio 1, conteniendo - Dulbecco's Modified Eagle, Gibco (10.05 mg/ml), bicarbonato de sodio (2 mg/ml), piruvato de sodio (1 mg/ml), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin (0.1 mg/ml), glutamina (0.292 mg/ml). A continuación, se coloca el bazo encima de un tamiz metálico y se lo macera con el émbolo de una jeringa plástica descartable - sobre una placa de Petri P35 conteniendo 1 ml de medio 1. Segui - damente se lava el tamiz por ambos lados sobre la placa de Petri con 2 ml de medio 1. Una vez finalizada esta operación, los 3ml de la suspensión de la placa de Petri se transfieren a un tubo - plástico con el extremo inferior en forma cónica, conteniendo 7 ml de medio 1, se deja decantar la suspensión 2 minutos a tempe - ratura ambiente, y el sobrenadante se transfiere a otro tubo se - mejante. A continuación, se centrifuga a 1000 rpm en centrífuga - clínica a 4° C. Se descarta el sobrenadante y en el mismo tubo se resuspenden las células en 5 ml de NH<sub>4</sub>Cl 0.17 M frío, se agi - ta el tubo y se deja en baño de hielo durante 10 minutos. Segui - damente se agregan 10 ml de medio 2 (medio 1 conteniendo suero - fetal bovino 15 % (v/v) previamente inactivado a 55° C durante - 30 minutos) y se centrifuga a 1000rpm en centrífuga clínica a 4°C

CAPITULO	II	PAGINA	138	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en 0.5 ml de medio 1. Seguidamente se agregan 20 ml del mismo medio - conteniendo  $10^7$  células de mieloma 63-Ag 8.6.5.3. y a continuación 30 ml nuevamente de medio 1. La suspensión se centrifuga - a 1000 rpm durante 10 minutos en centrífuga clínica a 4°C, se - descarta el sobrenadante y a las células sedimentadas, con el tubo sumergido en baño de agua a 37°C, se añade gota a gota 0.7 - ml de polietilén glicol 1300 50 % (p/v), durante 90 segundos, a - continuación se añade lentamente durante 2 minutos, 15 ml de medio 1. La suspensión se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y las células sedimentadas se resuspenden en 35-40 ml de medio 3, consistente en medio 2 conteniendo 50 % (v/v) de medio condicionado (medio 2 que sostuvo durante 3 días el crecimiento de los mielomas). Las células se siembran en dos placas de Petri grandes con 12 ml de medio cada una y - dos placas de Petri pequeñas con 6 ml de medio cada una. Las células se mantienen a 37°C en un incubador FORMA SCIENTIFIC en atmósfera de aire y CO<sub>2</sub> 5 %.

A las 24 horas se saca 1 ml del medio y se agrega 1 ml del medio 4 (medio HAT) compuesto por medio 2 conteniendo 0.01361 mg/ml de hipozantina 0.00378 mg/ml de timidina, 0.00176 mg/ml de aminoptericina, y medio 3 50 % (v/v). Durante tres días se repite esta - operación.

Cuando el número de células es suficientemente elevado (4º día) se despegan las células con ayuda de una pipeta plástica y se - transfiere la suspensión a "multi-placas" de cultivo colocando - 100 µl de la suspensión por placa (alrededor de 50 células). Al 5º día se saca todo el medio y se cambia por medio 4 (100 µl). Gradualmente se va agregando medio HAT, lo que lleva aproximadamente un mes. A continuación se agrega medio 5 (medio 4 sin aminoptericina) y medio 3 50 % (v/v) manteniéndose las células en estas condiciones durante un mes más aproximadamente, con cambio - de medio cada cuatro días.

El clonaje de los hibridomas se realiza por dilución (290). Los

CAPITULO	II	PAGINA	139	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

clones positivos (productores de anticuerpos con capacidad de inhibir la adenilato ciclase) se diluyen en medio 3 de tal forma - que quede una célula por 100  $\mu$ l de medio. Seguidamente, se transfieren las células a "multi-placas", poniendo 100  $\mu$ l por placa y se mantienen en las condiciones descritas con cambio de medio cada cuatro días.

Un esquema general del proceso de obtención de anticuerpos mono-clonales se representa en la figura 21.

#### XIX,3 DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN EL MEDIO CONDICIONADO POR HIBRIDOMAS

Para determinar la presencia de anticuerpos en los medios de cultivo de los hibridomas se procede de la siguiente forma:

en cajas de cultivo de 24 "multi-placas", se colocan filtros "millipore" (HOWPO 1300) en cada una de ellas, seguidamente se siembran 2  $\mu$ l de antígeno (1  $\mu$ g de proteína/ $\mu$ l en el centro del fil-tro y se deja secar a 4°. Se lava cada filtro 30 minutos con 1 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7.2 conteniendo NaCl 0.9 % (p/v)(TBS).

A continuación se agrega 1 ml de TBS conteniendo albúmina sérica bovina 2 % (p/v) (TBS-BSA) y se mantiene en agitación lento a 37 ° C durante 30 minutos, seguidamente se lavan los filtros con 1 ml de TBS durante 1 minuto y se agregan 0.5-1 ml de los medios - condicionados por hibridomas que se quieren ensayar, al mismo - tiempo se destinan diversos filtros como control en los que se - añade medio condicionada por hibridoma obtenidos con animales no inmunizados y medio condicionado por mielomas. Una vez agrega - dos los distintos medios a los filtros, se dejan con agitación - lenta durante 12-14 horas a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, se lava con 1 ml de TBS durante 30 minutos con agita-ción, ésta preparación se repite cinco veces. Seguidamente se -



CAPITULO	II	PAGINA	140	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

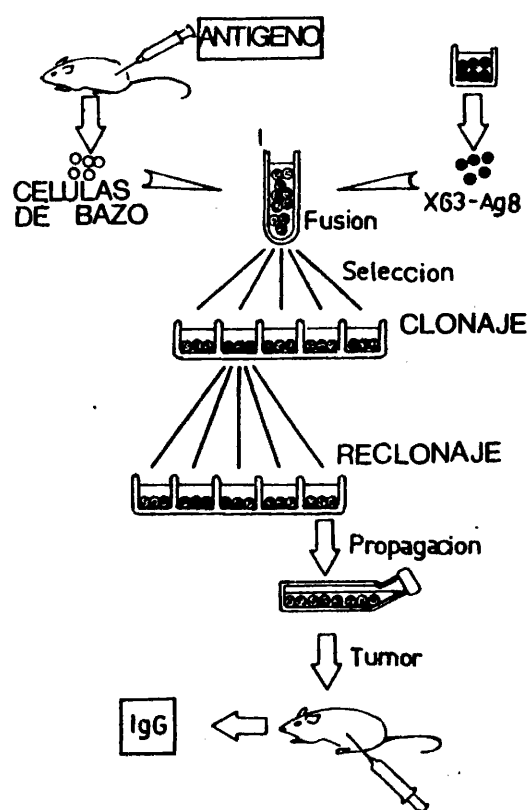


Figura 21. Esquema general de obtención de anticuerpos monoclonales.

CAPITULO	II	PAGINA	141	MATERIALES YMETODOS
----------	----	--------	-----	---------------------

colocan 500  $\mu$ l/placa de una dilución 1:300 de anti-inmunoglobulina de ratón, acoplada a peroxidasa (la solución concentrada se prepara resuspendiendo en 2 ml de TBS la muestra liofilizada, originaria de los laboratorios EAPPEL) y se mantiene dos horas con agitación a temperatura ambiente. Seguidamente se lava con 1 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7 durante 10 minutos y se añaden 500  $\mu$ l/placa de la siguiente solución: 0.5 ml de una solución de 10 mg de O-dianizina/ml en metanol, 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % (v/v), 20 ml de agua destilada, manteniendo las multiplacas con agitación durante 45-60 minutos.

La aparición de una mancha oscura sobre el filtro, en el lugar donde se aplicó inicialmente el antígeno es indicativo de la presencia de anticuerpos en el medio condicionado correspondiente.

#### XIX.4 DETERMINACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS PARA ADENILATO - CICLASA

La presencia de anticuerpos específicos para la adenilato ciclasa se determinó de la siguiente manera: la preparación enzimática (20  $\mu$ l, 16  $\mu$ g de proteína) correspondiente a la purificación de la adenilato ciclasa hasta el paso de filtración en gel (apartado VII,2 de esta sección de "Materiales y Métodos") se preincubaba con 20  $\mu$ l de cada uno de los medios de cultivo durante 180 minutos a 22° C. Seguidamente, en la mezcla se determina la actividad adenilato ciclasa en presencia de Mn<sup>+2</sup> como se especifica en el apartado V de esta sección de "Materiales y Métodos". De esta forma se seleccionaron los clones cuyos medios produjeron los mayores efectos inhibitorios sobre la actividad enzimática.

CAPITULO	II	PAGINA	142	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

## XX. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

### XX,1. DETERMINACION DE PROTEINAS

Se realiza por el método de Lowry et al (291): se toma un volumen de muestra entre 5-200  $\mu$ l y se añade 0.1 ml de NaOH 2N. A continuación se añaden 2 ml de una mezcla compuesta por:  $\text{NaCO}_3$  2 % (p/v) y tartrato sódico potásico 1 % (p/v),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5% (p/v). En proporción 50:1 (v/v) se agita y se deja 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregan 115  $\mu$ l de reactivo Folin-Ciocalteu 1.47 N y después de 15 minutos se mide la absorción de la mezcla de reacción a 700 nm. La recta patrón de concentraciones se calculó usando albúmina sérica bovina cristalina.

### XX,2. DETERMINACION DE FOSFATO LIBRE

A un volumen de muestra (2-40 nmoles de fosfato) se la lleva a 1 ml con agua destilada. Seguidamente se agregan 0.5 ml de una mezcla formada por Molibdato de amonio 3 % (p/v) y verde de malaquita (0.9 mg/ml) en HCl 6N en proporción 1:1 (v/v). Se agita y se deja a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Finalmente se mide la absorción de la mezcla a 650 nm.

### XX,3. DETERMINACIONES VARIAS

La caracterización del sustrato y productos de las mezclas de incubación en los ensayos de la actividad de la adenilato ciclasa se hizo por cromatografía en capa delgada (292) o cromatografía en papel (293).

CAPITULO	II	PAGINA	143	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

## XXI. PRODUCTOS

- 1.6- diamino hexano, ATP, GTP cAMP, Gpp(NH)p, NAD , NADH, alúmina neutra, citocromo c, malato deshidrogenasa, catalasa, albúmina sérica bovina, desoxirribonucleasa I, azul de dextrano, óxido de deuterio, fosfoenolpiruvato, veneno de serpiente (King Cobra), adenosina y piruvato quinasa de SIGMA CHEMICAL CO. (St. Louis, Missouri, U.S.A.).
- Hidroxilapatito (Bio Gel HTP), Bio Gel A5m, Resina AG 50 W-X4, Resina AG 1-X4, acrilamida, N, N'- metilenbisacrilamida, TEMED, SDS, glicina y Bio Gel P 60 de BIO RAD (richmond, California, U.S.A.).
- Trasilol de BAYER (Leverkusen, R.F.Alemania).
- O-nitrofenil-D-galactósido de KOCH-LIGHT (Colbrook, Bucks, Inglaterra).
- toxina del cólera de SCHWARZ/MANN (Orangeburg, New York, U.S.A)
- lactato deshidrogenasa, creatina quinasa y mioquinasa de BOEHRINGER (Mannheim, R.F.Alemania).
- 3-isobutil-1-metilxantina y 2'3'-Isopropilidenadenosina de ALDRICH CHEMICAL CO. INC. (Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.).
- colato de sodio y azul de coomassie R 250 de FLUKA (Buchs, Suiza).
- Fosfato inorgánico marcado con  $^{32}\text{P}$  de AMERSHAM INTERNATIONAL LTD (Buckinghamshire, Inglaterra).
- $[^3\text{H}]$  cAMP y  $[^{14}\text{C}]$  NAD de NEW ENGLAND NUCLEAR (Boston, Massachusetts, U.S.A.).
- DEAE-celulosa de 52 de WHATMAN (Kent, Inglaterra).
- proteínas de bajo peso molecular para recta de calibrado de pesos moleculares en electroforesos de SDS-poliacrilamida, Azul-Sepharosa CL-GB y DEAE-Sephadex A-25 de PHARMACIA FINE CHEMICALS (Uppsala, Suecia).

CAPITULO	II	PAGINA	144	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

- solución de Ampholine (rango pH 4-6) y Ultrogel AcA 34 de LKB (estocolmo, Suecia).
- suero de conejo anti-IgG de ratón y suero de cobra anti-IgG de ratón con peroxidasa conjugada de CAPPEL LAB. (Cochranville, U.S.A.).
- Bromuro de cianógeno de PIERCE CHEMICAL CO. (Rockford, Illinois U.S.A.).

Todos los demás productos utilizados que no aparecen especificados en este apartado son de grado reactivo, de MERCK (Darmstadt, R.F.Alemania) o de SIGMA CHEMICAL CO. (St. Louis, Missouri, U.S.A.).

## XXII. INSTRUMENTACION

- Ultracentrífuga BECKMAN modelo L5-50 (California, U.S.A.).
- Fuente de tensión para electroforesis y electroenfoque LKB modelo 2103 (Estocolmo, Suecia).
- Espectrofotómetro GILFORD 260 (Oberlin, Ohio, U.S.A.).
- Baño de agua termostático con flujo circulante para refrigeración de electroforeses y electroenfoque LKB 2209 Multi Cool (Estocolmo, Suecia).
- Bomba peristáltica LKB 2120 (Estocolmo, Suecia).
- Colector de fracciones, LKB 2070 Ultra Rac II (Estocolmo, Suecia).
- columna electroenfoque 110 ml, LKB 8100 (Estocolmo, Suecia).
- pH-metro Radiometer 26 (Copenhague, Dinamarca)
- Espectrofotómetro Coleman, Junior II modelo 6/20 (Maywood, Illi

CAPITULO	II	PAGINA	145	MATERIALES Y METODOS
----------	----	--------	-----	----------------------

nois, U.S.A.).

- Incubador con agitación para cultivos, New Brunswick Sci. Co. Inc. modelo R 25 (New Jersey, U.S.A.).
- Baños con agitación, modelo G76, New Brunswick Sci. Co. Inc. - (New Jersey, U.S.A.).
- Evaporador rotatorio, RE 120, Büchi (Suiza).
- Liofilizador, FTS Systems Inc. de 14 l. (New York, U.S.A.).
- centrífuga clínica o de baja velocidad, Sorvall GLO-4 (Conneticut, U.S.A.).
- Incubador de cultivo, Forma Scientific, modelo 3185 (Ohio, U.S.A.).
- contador de centelleo, Beckman LS 8100 (California, U.S.A.).

CAPITULO	III	PAGINA	146	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

RESULTADOS Y

DISCUSION

CAPITULO III	PAGINA 147	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

# I. SOLUBILIZACION DE LA ADENILATO CICLASA DE NEUROSPORA CRASSA

Como ya fué comentado en la Introducción (apartado XVI,2) Flawiá y Torres, describieron en una serie de publicaciones, la existencia de una actividad de adenilato ciclasa asociada a membrana en la mutante "slime" de Neurospora crassa. Esta enzima es dependiente de  $Mn^{+2}$  para expresar su actividad, e insensible al fluoruro, la toxina del cólera y los nucleótidos de guanosina.

Tales propiedades fueron posteriormente demostradas en adenilato ciclasas de eucariotes inferiores como Mucor rouxii (234), Blastocladiella emersonii (224), Saccharomyces cerevisiae (19) y Tripanosoma cruzi (246) y además, en la fracción citoplasmática de células germinales de testículo de rata (28)(29). En bacterias y organismos eucariotes inferiores, tales como Phycomyces y Tetrahymena, la adenilato ciclasa puede expresar su actividad en presencia de  $Mg^{+2}$ , sin embargo, al igual que en los organismos antes mencionados, la enzima es insensible al fluoruro, la toxina del cólera y los nucleótidos de guanosina.

Por otra parte, en la variante  $cyc^-$  del linfoma  $S_{49}$ , en la cual existe una disfuncionalidad en el componente regulador (N) de la adenilato ciclasa, el componente catalítico tiene una marcada dependencia del  $Mn^{+2}$  para expresar su actividad catalítica y, al igual que en los organismos mencionados, la enzima es insensible al fluoruro, la toxina del cólera y los nucleótidos de guanosina (apartado VIII,1 Introducción).

Establecer las posibles relaciones existentes, tanto moleculares como funcionales, entre la adenilato ciclasa de eucariotes inferiores y el componente catalítico (C) de la enzima de eucariotes superiores, fué uno de los objetivos que motivó el presente estudio.

En los primeros trabajos sobre la adenilato ciclasa de N. crassa Flawiá y Torres, utilizaron la cepa "slime", debido a que, al carecer de pared celular, las células pueden romperse con mayor facilidad, obteniéndose de esta forma, membranas plasmáticas con



CAPITULO III	PAGINA 148	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

alto grado de pureza y buen rendimiento.

Las cepas miceliales de N. crassa, poseen también una actividad de adenilato ciclasa, sin embargo, las características de esta actividad enzimática no han sido estudiadas en detalle. Se conocen, fundamentalmente, dos propiedades:

1. La actividad enzimática es dependiente de  $Mn^{+2}$
2. Esta actividad está ausente en las cepas del fenotipo "crisp" portadoras de la mutación cr-1 (apartado XVI,4 Introducción)

Experimentos preliminares mostraron que cierta preparación de la actividad de la adenilato ciclasa de un homogeneizado de la cepa salvaje de N. crassa (StL 74), permanecía en el sobrenadante después de centrifugación a 105000 xg, durante 60 minutos. Este hecho podría indicar la existencia de una forma soluble de adenilato ciclasa en N. crassa. La importancia de esta observación, desde un punto de vista operativo, reside en que los sistemas adenilato ciclasa, sensibles a hormona en eucariotes superiores, están fuertemente asociados a membrana, y su solubilización y caracterización requieren el empleo de detergentes, mientras que en N. crassa, sería factible encarar estos estudios sin el uso de los mismos.

El primer enfoque experimental, estuvo destinado a establecer fehacientemente, la existencia de una forma soluble de adenilato ciclasa en N. crassa. Para ello, se realizó el fraccionamiento de un homogeneizado de micelio de la cepa StL 74, mediante centrifugación diferencial. El micelio fue homogeneizado, según se describe en "Materiales y Métodos". El extracto se centrifugó a 1100 x g durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue sometido a centrifugación a 12000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante fue centrifugado, finalmente, a 105000 x g durante 120 minutos. Los resultados de esta experimento se muestran en la Tabla VI.

De los datos incluidos en la Tabla VI, puede concluirse lo siguiente:

ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA
--

CAPITULO	III	PAGINA	149	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

FRACCION	VOLUMEN (ml)	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA	
			TOTAL (pmoles/min)	ESPECIFICA (pmoles/min/mgProt)
Homogenato	35	507	3907	7.7
1.100xg(sedimen to)	15	20	1140	5.7
12.000xg(sedi - mento)	4	28	356	12.7
105.000xg(se- dimento)	10	91	2060	22.7
105.000xg sobre nadante	23	163	1403	8.6

TABLA VI

Distribución de la actividad de adenilato ciclasa después de una centrifugación diferencial de un micelio de la cepa StL 74. Los sedimentos de cada centrifugación fueron homogeneizados en Tam - pón A.

CAPITULO	III	PAGINA	150	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

1. La fracción con mayor actividad (total y específica) corresponde al sedimento de 105000 x g (microsomas y membranas plasmáticas). Sin embargo, se encuentra una cantidad considerable de enzima en el sedimento de 1100 x g. Esta fracción corresponde a núcleos, células no rotas y pared celular. La presencia de actividad en esta fracción, podría deberse a una ruptura incompleta del micelio o a la adhesión a la pared celular de fragmentos de membrana plasmática.
2. Un 40 % de la actividad de la adenilato ciclasa, presente en el sobrenadante de 12000 x g, permanece en la fracción soluble, después de la centrifugación a 105000xg, durante 120 minutos.

Con el fin de determinar si la existencia de una forma soluble de adenilato ciclasa era una propiedad exclusiva de la cepa salvaje StL 74 de N. crassa, o si era una característica común con otras cepas, se realizaron centrifugaciones diferenciales de micelios de las cepas salvajes FGSC 927, 2218, .757 y 681.

Los porcentajes de la actividad enzimática, encontrada en el sobrenadante después de centrifugación a 105000 x g, respecto de la presente en el sobrenadante de la centrifugación a 12000 x g por cada cepa, se encuentran en la Tabla VII.

En todas las cepas la enzima se mantuvo en la fracción soluble, después de una nueva centrifugación a 105000 x g durante 180 minutos.

La presencia de una forma soluble de adenilato ciclasa en Neurospora crassa, puede ser interpretada de diferentes formas. Una de ellas, es suponer que las formas sedimentable y soluble representan dos enzimas diferentes codificadas por distintos genes. Esta posibilidad quedaría descartada por la siguiente evidencia: la actividad de adenilato ciclasa en la cepa FGSC 483 es despreciable, tanto en las fracciones del sedimento, como del sobrenadante de una centrifugación a 105000 x g. Esta cepa es portado-

CAPITULO	III	PAGINA	151	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

<u>CEPA</u>	<u>ADENILATO CICLASA</u> <u>% DE ACTIVIDAD EN EL S 105</u>
StL 74	32.0
FGSC 984	26.5
FGSC 2218	20.2
FGSC 1757	23.7
FGSC 691	24.8

TABLA VII

Porcentaje de la actividad de adenilato ciclasa que permanece en un sobrenadante de 105000 x g respecto de la presente en un sobrenadante de 12000 x g en distintas cepas miceliales de N. crassa. Las condiciones del fraccionamiento fueron descritas en el texto y en "Materiales y Métodos".

CAPITULO	III	PAGINA	152	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

ra de la mutación cr-1, y presenta fenotipo "crisp", en ella los niveles miceliales de cAMP son diez veces más bajos que los de - las cepas que llevan el gen cr-1 salvaje.

Al estar ambas actividades, soluble y sedimentable, afectadas - por la presencia de una mutación en un único locus (cr-1), se - puede concluir que son dos formas de la misma molécula enzimática con diferente localización celular.

Existe pues la posibilidad de que la adenilato ciclasa de Neuros pora crassa sea una proteína de las denominadas periféricas de - membrana, esto es, que estuviera débilmente unida a la membrana, y que parte de la actividad enzimática se liberara al sobrenadante durante los procesos de homogeneización y centrifugación diferencial. De ser así, la actividad enzimática debería ser extraída en mayor proporción, en forma soluble, con soluciones salinas de alta fuerza iónica.

Finalmente, otra posibilidad a tener en consideración, es que la forma soluble de la adenilato ciclasa podría ser consecuencia de un proceso de proteólisis de la forma unida a membrana.

Estas dos posibilidades, fueron consideradas en el experimento - que resume la Tabla VIII. De él se puede deducir que la proporción de la actividad adenilato ciclasa en la fracción soluble, - después de centrifugación a 105000 x g, es mayor al aumentar la fuerza iónica del tampón de homogeneización, lo cual permite suponer que la adenilato ciclasa de N. crassa es una enzima débilmente asociada a membrana. Por otra parte, al no variar el porcentaje de la actividad enzimática en el sobrenadante de la centrifugación a 105000 x g en presencia de inhibidores de la actividad proteolítica, descartaría la implicación de dicha actividad en el proceso de solubilización de la enzima.

CAPITULO III	PAGINA 153	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

ADICIONES AL TAMPON DE HO MOGENEIZACION	FRACCIONES	ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA	
		TOTAL (pmol/min)	ESPECIFICA (pmol/min/mg proteín)
NINGUNA	Extracto	180	-
	Sedimento10000xg	52	18
	Sedimento105000xg	80	50
	Sobrenadante105000 xg	62	16
NaCl 0.5 M	Extracto	160	-
	Sedimento10000xg	38	16
	Sedimento105000xg	33	23
	Sobrenadante105000 xg	90	21
NaCl 0.5 M PMSF 5 mM	Extracto	151	-
	Sedimento10000xg	35	15
	Sedimento105000xg	30	23
	Sobrenadante105000 xg	90	22
NaCl 0.5 M Trasilol1000U/ml	Extracto	148	-
	Sedimento10000xg	36	13
	Sedimento105000xg	28	23
	Sobrenadante105000 xg	88	21

TABLA VIII

Distribución de la actividad de adenilato ciclasa en fracciones de diferentes centrifugaciones diferenciales de extractos miceliales de *N.crassa* StL<sup>74</sup>.

El micelio liofilizado(50mg) se homogeneizó en 2ml de tampón A, -conteniendo o no NaCl 0.5M, PMSF 5mM o trasilol 1000U/ml. Los extractos fueron centrifugados a 1000xg durante 10 minutos y los sobrenadantes obtenidos fueron centrifugados a 105000xg durante 10 minutos. Las fracciones obtenidas de esta forma se resuspendieron en el tampón de homogeneización.

CAPITULO	III	PAGINA	154	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

## II. PURIFICACION DE LA ADENILATO CICLASA DE NEUROSPORA CRASSA

Se partió de la cepa salvaje StL 74 de N. crassa, empleando como medio de homogeneización tampón A, conteniendo NaCl 0.5 % M, debido a que el rendimiento de la actividad enzimática obtenida en la fracción soluble después de centrifugación a 105000 x g es mayor, tal como se especificó en el apartado anterior. Un esquema general del proceso de purificación se muestra en la figura 22.

### II,1 CROMATOGRAFIA EN HEXILAMINO-SEPHAROSA

El primer paso de purificación consistió en cromatografiar un sobrenadante de 105000 x g (S<sub>105</sub>) en una columna de Hexilamino-Se-pharosa. La figura 23 muestra el perfil de elución de la colum-na. Un 50 % de la proteína, aproximadamente, eluye con el lava-do, la adenilato ciclasa eluye en un pico estrecho a una concen-tración de NaCl de 0.5 M, con una actividad específica de 136 - pmol/min/mg de proteína. Este valor es aproximadamente 10 veces mayor que el correspondiente al S<sub>105</sub>.

### II,2 FILTRACION EN BIO-GEL A 5 m

La adenilato ciclasa obtenida de la cromatografía en hexilamino-sepharosa, una vez dializada, se intentó precipitar con sulfato de amonio, sulfato de vinblastina, CaCl<sub>2</sub>, acetona etc, en todos los casos la pérdida de actividad era del orden del 80 %. De - ahí que se empleara como método de concentración de la muestra - la ultrafiltración en membranas de Amicón PM 30, este sistema resultó mucho menos drástico y permitió llevar la preparación enzi-

CAPITULO	III	PAGINA	155	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

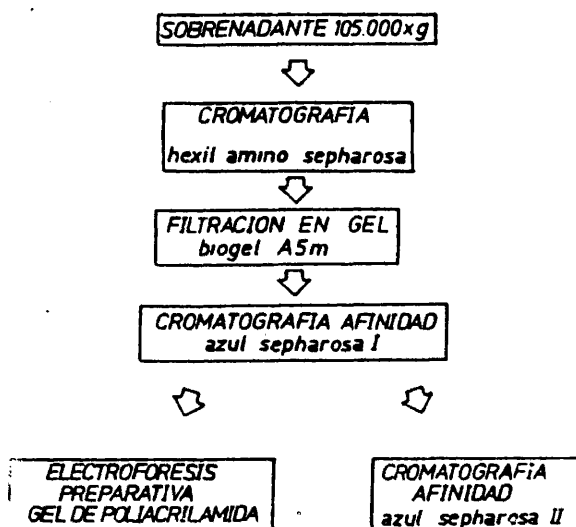


Figura 2. Esquema general del proceso de purificación de *Trichogramma brassicae* adeniato. Trichogramma brassicae.



CAPITULO	III	PAGINA	156	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

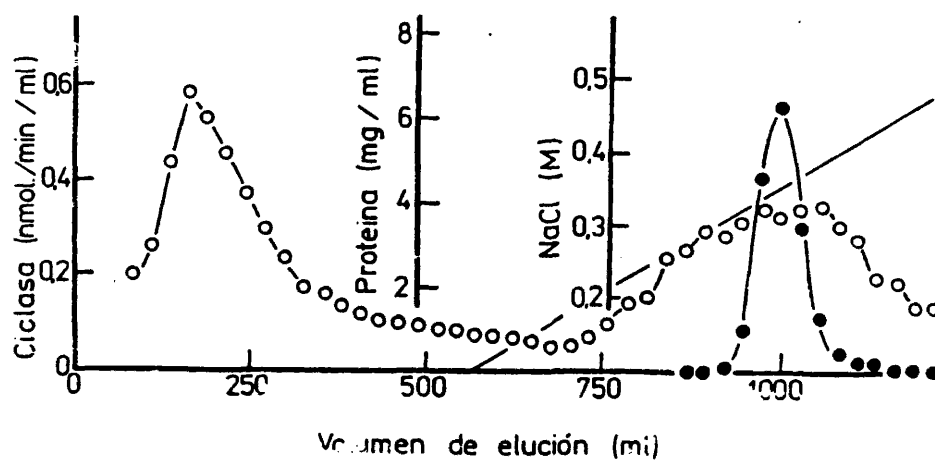


Figura 23. Cromatografía en columna de hexil-agarosa. Se usó un sobrenadante de *V. parvulus*.

Se usó una columna de 100 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro, equilibrada con tampón de 0.1 M de NaCl y 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5. La columna se lavó con 100 ml de tampón de 0.1 M de NaCl y 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5, y se aplicó un volumen de 100 ml de sobrenadante de *V. parvulus*. Se usó un tampón de 0.1 M de NaCl y 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5, como tampón de elución. Se usó un tampón de 0.1 M de NaCl y 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5, como tampón de elución. Se usó un tampón de 0.1 M de NaCl y 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5, como tampón de elución.

CAPITULO	III	PAGINA	157	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

mática a un volumen de 7 ml, el cual resultó óptimo para la aplicación sobre la columna de Bio-Gel A 5m. Si la concentración se llevaba a un menor volumen, se producía una visible precipitación de proteína, con la consiguiente pérdida de actividad de adenilato ciclasa. El perfil de elución de la columna se muestra en la figura 24, la actividad de adenilato ciclasa eluye como un único pico.

### II.3 CROMATOGRAFIA EN AZUL-SEPHAROSA

Las condiciones para la absorción de la adenilato ciclasa a la azul-sepharosa, variaron de una preparación a otra, de aquí que en cada caso hubo de ensayarse tales condiciones. Aunque la absorción de la enzima a la resina aumentaba a valores de pH por debajo de 7 (Pipes 50 mM pH 6.5) la recuperación de la actividad enzimática después de la cromatografía en estas condiciones disminuía sustancialmente.

El perfil de elución de la columna se muestra en la figura 25, la mayor cantidad de proteína eluyó con el lavado, arrastrando una pequeña cantidad de adenilato ciclasa, la mayor proporción de la enzima eluyó de la columna en un pico ancho a una concentración de NaCl entre 0.2 y 0.6 M.

Como método alternativo de purificación se realizó una recromatografía en columna de azul sepharosa, la actividad de adenilato ciclasa eluyó a una concentración de NaCl, similar a la de la primera cromatografía.

CAPITULO	III	PAGINA	158	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

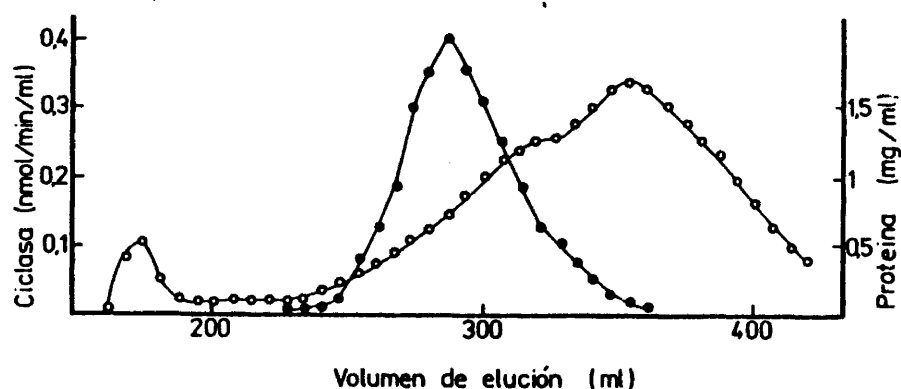


Figura 24. Cromatografía en columna de Bio-Gel A5m de una - preparación hexilamino-sepharosa de N. crassa.

Se aplicaron 7 ml (25 mg de proteína/ml) a una columna con - un lecho de resina de 2.5x87 cm, equilibrada con tampón A, - conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM. La elución se realiza con el mismo tampón de equilibrado a un flujo de 2.5 ml/min, re- cogiéndose fracciones de 7 ml.

(●) actividad de adenilato ciclase  
(○) Proteína

CAPITULO	III	PAGINA	159	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

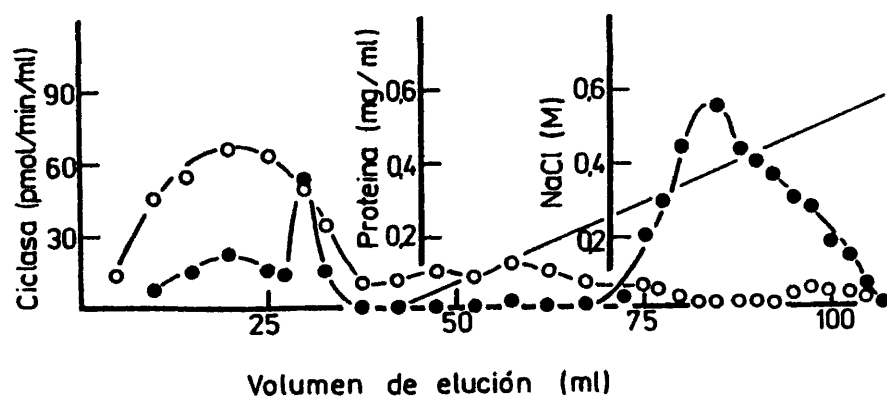


Figura 25. Cromatografía en columna de azul-sepharosa de una preparación de Bic-Gel de *N. crassa*.

Se aplicaron 15 ml (1 mg de proteína/ml) a una columna - con un lecho de resina de 0.9x15 cm, equilibrada con tampón A, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM, se lavó con 30 ml del tampón de equilibrado y se aplicó un gradiente lineal formado por tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 0.8 M. El volumen total del gradiente es de 120 ml, el flujo de elución es de 1.5 ml/min y se recogen fracciones de 5 ml.

(●) actividad de adenilato ciclasa  
(○) Proteína

CAPITULO	III	PAGINA	160	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

#### II,4 ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Como un paso alternativo de purificación, se efectuó una electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida de la preparación - Azul-Sepharosa I, el perfil de elución se muestra en la figura - 26. El principal inconveniente de este método de purificación, consiste en la inactivación de la enzima a lo largo del proceso. Esto lleva a obtener una recuperación del orden del 0.05 % de la actividad inicial en el S<sub>105</sub>.

Este método alternativo tiene tan sólo valor, desde un punto de vista cualitativo.

#### II,5 DISCUSION

El principal problema que surge en la purificación de la adenilato ciclasa de N. crassa, es la inactivación gradual de la enzima lo que se hace bien patente después de la filtración en Bio-Gel. La pérdida de actividad enzimática no se logró paliar ni con el agregado de glicerol (hasta un 15 % v/v), ni por un aumento en la concentración de 2-mercaptoetanol en los tampones empleados - en los distintos pasos de purificación.

La recuperación de la actividad enzimática, después de la segunda cromatografía en azul-sepharosa fué del 2-3 % (Tabla IX). En la figura 27 se muestra un gel analítico en SDS-poliacrilamida - de las diferentes preparaciones de la adenilato ciclasa obtenidas a lo largo del proceso de purificación.

En la figura 28, se muestra un gel analítico en SDS-poliacrilamida, teñido con AgNO<sub>3</sub>, correspondiente a la fracción obtenida después de la segunda cromatografía en azul-sepharosa. Puede apreciarse la presencia de una sola banda correspondiente a un peso molecular de 65000 D. Si bien, la purificación alcanzada, según

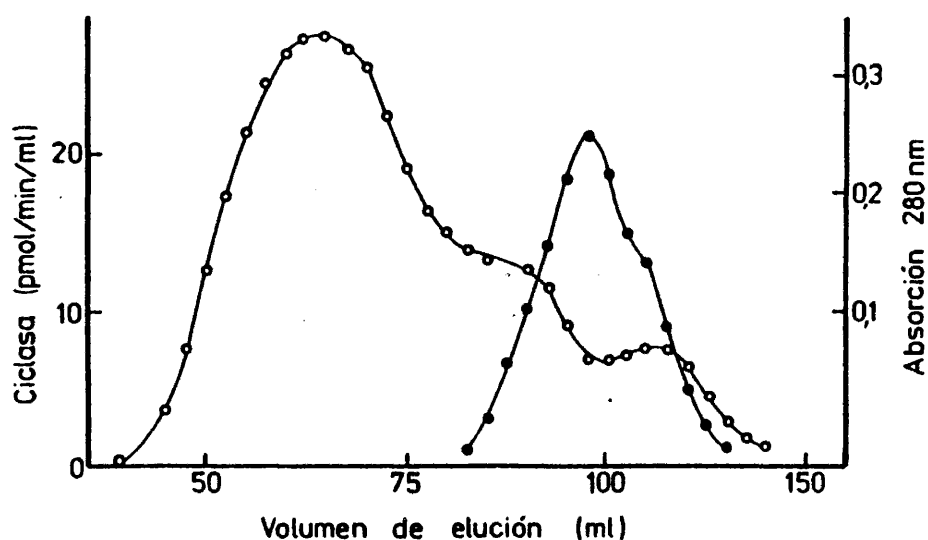


Figura 26. Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida de una preparación azul-sepharosa de *N. crassa*.

El gel inferior es del 5 % de acrilamida, con una longitud de 4 cm. El gel superior es del 3.5 % de acrilamida, con una longitud de 1 cm. Se siembra 1 ml de muestra (0.5 mg de proteína) y se aplicó una intensidad de corriente de 10 mA durante 5-6 horas, la elución se realiza con tampón Tris-HCl 0.37 M pH 8.4, conteniendo glicerol 5 % (v/v) el flujo de elución es de 15 ml/h, y se recogen fracciones de 2 ml.

(●) actividad de adenilato ciclasa  
(○) Proteína

CAPITULO	III	PAGINA	162	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

FRACCION	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA		RECUPE RACION %
		TOTAL (pmol/min)	ESPECIFICA (pmol/min/mgprot)	
S <sub>105</sub>	3000	43000	14	100
Hexilamino- Sepharosa	220	30000	136	70
Bio-Gel	20	12000	600	30
Azul-Sepharosa I	0.5	2700	5400	6
Azul-Sepharosa II	<0.1	1200	12000	3

TABLA IX

Purificación de la adenilato ciclasa de Neurospora crassa.

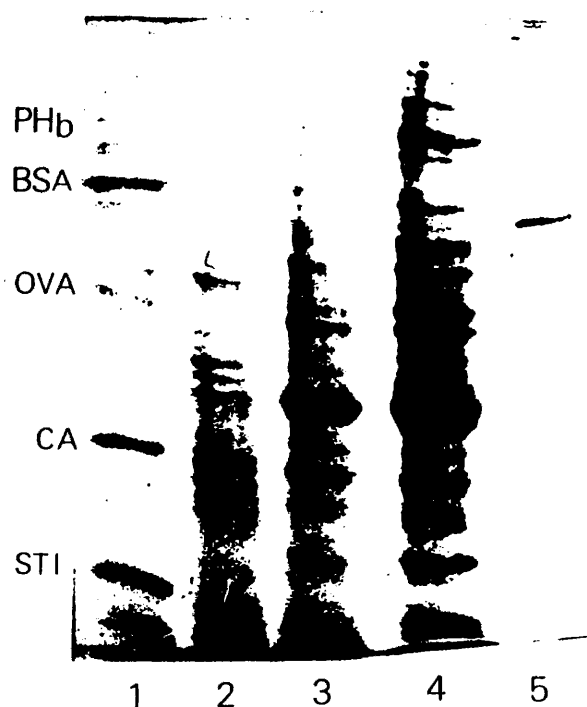


Figura 27. Electroforesis analítica en gel de SDS-poliacrilamida (10 % p/v) de alicuotas de los diferentes pasos de purificación de la adenilato ciclasa de *N. crassa*.

1. Proteínas marcadoras; PH b, fosforilasa b; BSA, seroalbúmina bovina; OVA, ovoalbúmina; CA, anhidrasa carbónica; STI, inhibidor de tripsina de soja. 2.S<sub>105</sub> (100 µg de proteína). 3. Hexilamino-sepharosa (100 µg de proteína). 4. Bio-Gel (50 µg de proteína). 5. Azul-Sepharosa I - (25 µg de proteína).

El gel fué teñido con Azul de Coomassie R250.



CAPITULO III	PAGINA 164	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

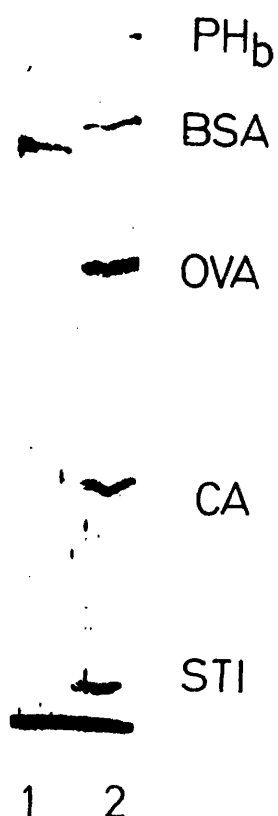


Figura 28. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (10 % p/v).

1. Preparación azul-sepharosa II (2  $\mu$ g de proteína)
2. Proteínas marcadoras, abreviaturas iguales a las de la figura 27. El gel fué teñido con AgNO<sub>3</sub>

CAPITULO III	PAGINA 165	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

los datos experimentales es del orden de las 850 veces (Tabla IX) si se asume que se recuperó la enzima cuantitativamente, aunque parcialmente inactivada, la purificación alcanzada podría ser - del orden de las 10000 veces. La cantidad de proteínas obtenida en este último paso de purificación fué del orden de los 100  $\mu$ g, lo que representa un 0.003 % de la proteína del extracto inicial (S<sub>105</sub>).

Cuando se realizó, como paso final alternativo de purificación, en lugar de la azul-sepharosa II, la electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, la recuperación de la actividad enzimática fué mucho menor que en el caso anterior. La electroforesis analítica en gel de SDS-poliacrilamida de las fracciones combinadas donde se detectó actividad de adenilato ciclasa, reveló la - presencia, nuevamente, de una única banda, con un peso molecular correspondiente a 65000 D., confirmando la posibilidad de que dicho polipéptido estuviese asociado con la actividad de adenilato ciclasa. Aunque la tinción con Ag NO<sub>3</sub> es del orden de 100 veces más sensible que la tinción con azul coomassie (285), puede llegarse a suponer que la banda de peso molecular 65000 D. observada en los geles teñidos con Ag NO<sub>3</sub>, pudiera representar un contaminante presente en mayor concentración, tanto en la preparación de la azul-sepharosa II, como en la de la electroforesis preparativa, siendo la banda correspondiente a la adenilato ciclasa una banda minoritaria casi no observable en dichos geles. Con el fin de descartar o confirmar esta posibilidad se realizaron dos experimentos:

1. En primer lugar, se caracterizaron los productos de la reacción de adenilato ciclasa catalizada por la preparación azul sepharosa II por cromatografía en papel. El cAMP fué la única sustancia radiactiva producida, tanto en presencia como - en ausencia de sistema regenerante de ATP o de cAMP y 3-isobutil-1-metilxantina en la mezcla de reacción. Además la - cantidad máxima de cAMP producido por esta preparación enzimática, no se vió modificada por la omisión del sistema rege

CAPITULO III	PAGINA 166	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

nerante de ATP, cAMP o inhibidores de la fosfodiesterasa en la mezcla de reacción.

Estos resultados indicarían que la preparación azul-sepharosa II carece de otras actividades enzimáticas distintas de la adenilato ciclasa, capaces de usar el ATP como sustrato (por ejemplo, la ATPasa) así como de fosfodiesterasa de cAMP.

2. En segundo lugar, se realizó un ensayo de localización de la actividad de adenilato ciclasa en los geles de SDS-poliacrilamida en condiciones renaturalizantes, tal como se especifica en el apartado X,2 de "Materiales y Métodos". En cinco experimentos distintos, partiendo de preparaciones de la enzima, correspondientes al Bio-Gel o a la azul-sepharosa I, sólo se detectó actividad de adenilato ciclasa en la zona del gel correspondiente a un peso molecular de 65000 D. aproximadamente (Figura 29).

Las evidencias presentadas, permitirían concluir que la banda de 65000 D., observada en los geles de SDS-poliacrilamida de la preparación de adenilato ciclasa, purificada por cualquiera de los dos pasos finales alternativos empleados, estaría asociada con dicha actividad enzimática.

En definitiva, se puede contar de esta forma con un método rápido y simple de purificación de la adenilato ciclasa de N. crassa. A pesar de que la adenilato ciclasa desempeña un importante papel en la regulación del metabolismo, desde su descubrimiento por Sutherland, se ha avanzado muy poco en lo que se refiere a su purificación. Esta situación se debe a varias razones:

1. En casi todos los tejidos, la adenilato ciclasa es una enzima de membrana y su purificación requiere que los procedimientos de fraccionamiento se lleven a cabo en presencia de detergentes.
2. La enzima, probablemente, constituye menos de un 0.005 % de la proteína total de la membrana.

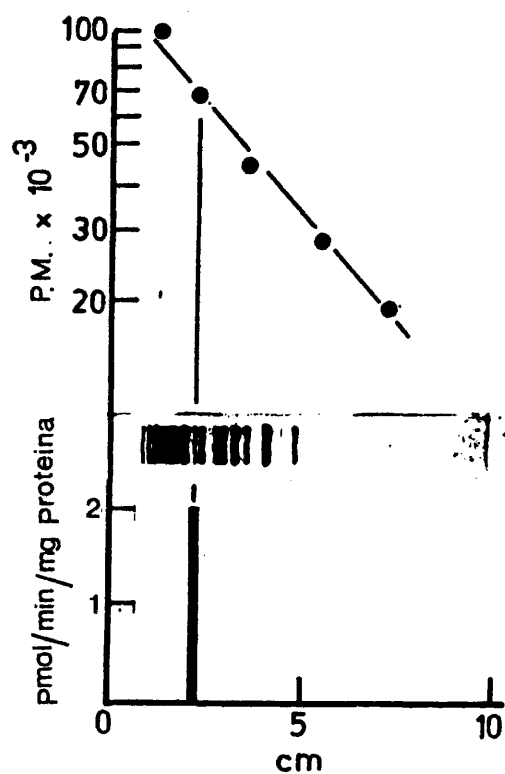


Figura 29. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida 10 % (p/v) de una preparación de Bio-Gel, correccionado con la curva de calibración de pesos moleculares de dicho gel y con la posición donde se localizó la sección del mismo, con actividad de adenilato ciclasa, según se especifica en el apartado X,2 de "Materiales y Métodos".

CAPITULO III	PAGINA 168	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

### 3. La actividad enzimática es extremadamente lábil.

La primera de estas dificultades no existe en el caso de la enzima de Neurospora, ya que puede obtenerse en forma soluble sin el uso de detergentes.

Con respecto al último inconveniente, se ha conseguido paliar, en parte, realizando todas las etapas de purificación en forma secuencial, empleando no más de cinco días en todo el proceso.

Existen algunos trabajos en la literatura científica que describen métodos de purificación parcial de la adenilato ciclasa (294) pero en pocos casos se ha mostrado evidencia de haberse efectuado la purificación a homogeneidad de la enzima, en este último aspecto dos trabajos merecen destacarse. En primer lugar, Takai et al (210) purificaron hasta aparente homogeneidad la adenilato ciclasa de Brevibacterium liquefaciens, siguiendo procedimientos convencionales como precipitación ácida, precipitación con sulfato de amonio y cromatografías en columnas de hidroxilapatito, DEAE-Sephadex y Sephadex G-200, los autores lograron purificar la enzima 4500 veces, con un rendimiento del 10 %. La enzima purificada fué cristalizada y presentó un peso molecular de 92000 D., estando constituida por dos polipéptidos idénticos de 46000 D. También se determinaron la composición de aminoácidos, comprobando la presencia de un alto porcentaje de aminoácidos ácidos e hidrofóbicos y la ausencia total de cisteína.

En segundo lugar, Kornblihtt et al (29), llevaron a cabo la purificación de la adenilato ciclasa soluble de testículo de rata, mediante cromatografía en DEAE celulosa, filtración en gel y electroenfoque. La enzima purificada resultó estar constituida por una sola cadena polipeptídica de 70000 D. aproximadamente.

Es interesante destacar, que la actividad específica de la enzima pura de B. liquefaciens (30 nmol/min/mg de proteína) y de testículo de rata (12 nmol/min/mg de proteína) son del mismo orden de magnitud que el que presenta la enzima purificada de N. crassa (12 nmol/min/mg de proteína).

CAPITULO III	PAGINA 169	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

Otra cuestión importante a tener en cuenta es que hasta la fecha las únicas adenilato ciclasas que han podido purificarse a homogeneidad, tienen en común su insensibilidad al fluoruro, la toxina del cólera y los nucleótidos de guanosina.

En lo que respecta a las adenilato ciclasas de eucariotes superiores, sensibles a estos compuestos, sólo existe un trabajo en la literatura que proclama haber purificado una actividad de adenilato ciclasa (la de cerebro bovino) a homogeneidad (295). Los autores Stellwagen y Baker, utilizaron cromatografía de afinidad en azul-sepharosa, seguida de una cromatografía en DEAE-celulosa consiguiendo una purificación de 250 veces con un rendimiento del 20 %. Estos resultados parecen poco convincentes si se tiene en cuenta lo siguiente:

1. Con posterioridad al trabajo de Stellwagen, el grupo de Haber (296), presentó evidencias indicando que la resina azul-dextrano-sepharosa no es capaz de unir a la adenilato ciclasa de corazón canino, solubilizada con detergentes.
2. Parece poco probable que con una purificación de sólo 250 veces, se obtenga una adenilato ciclasa en estado homogéneo, sobre todo, teniendo en cuenta que, en la mayoría de los tejidos analizados, la adenilato ciclasa constituye una proporción extremadamente baja de la proteína total de la célula.
3. En el segundo paso de purificación del trabajo de Stellwagen y Baker, la enzima eluye de una columna de DEAE-celulosa equilibrada a pH 8 a una concentración de Na Cl de 0.9 M. Este hecho parece bastante inusual, si se tiene en cuenta que las adenilato ciclasas de testículo (29), corazón canino (296) hígado de rata (297). Fasciola hepática (298) y Brevibacterium liquefaciens (210), eluyen de columnas de DEAE-celulosa equilibradas a pH neutro o ligeramente alcalino, a concentraciones de 0.2 y 0.3 M.
4. Finalmente, Neer (33), determinó mediante gradientes de sacarosa y filtraciones en geles de preparaciones no purificadas

CAPITULO	III	PAGINA	170	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

un peso molecular de 220000 D. para la adenilato ciclasa de cerebro bovino (valor que coincide con los determinados para las adenilato ciclasas de membrana de otros tejidos).

Sin embargo, Stellwagen y Baker, encuentran que la adenilato ciclasa "pura" del mismo órgano, presenta una única banda polipeptídica en geles de SDS-poliacrilamida, correspondiente a un peso molecular de 16000 D.

De acuerdo con este último dato, la molécula nativa debería estar formada por la unión de no menos de 13 polipéptidos idénticos, de peso molecular 16000 D., lo que parece algo ciertamente improbable.

Por otra parte, Homcy et al (296), demostraron que la adenilato ciclasa de corazón canino se absorbía específicamente a una resina de ATP-sepharosa, después de haber resuelto esta actividad de otras proteínas hidrofóbicas, mediante cromatografía en dodecil-sepharosa. Los autores obtuvieron una purificación de la enzima de unas 500 veces, sin embargo, no se llegó a obtenerla en estado homogéneo. La actividad específica fué de 98 nmoles/min/mg de proteína y el rendimiento osciló entre el 1 y el 4 %.

La purificación de la adenilato ciclasa de N. crassa, no sólo permite avanzar en el conocimiento a nivel molecular de esta enzima, sino que permite afrontar la obtención de anticuerpos específicos.

### III. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA DE N. CRASSA

CAPITULO III	PAGINA 171	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

### III,1. ELECTROENFOQUE EN GRADIENTE DE SACAROSA

Con el fin de determinar el punto isoléctrico de la adenilato ciclasa de N. crassa, una alícuota de una preparación de hexilamino-sepharosa fué sometida a un electroenfoque en gradiente de sacarosa con un rango de pH de 4 a 6 unidades. En la figura 30 se muestra el resultado de dicho experimento. Pudo detectarse la presencia de un único pico simétrico de actividad de adenilato ciclasa a un pH de 4.6.

### III,2. FILTRACION EN GEL (BIO-GEL A 5 m)

La figura 31 muestra el perfil de deducción de una preparación de hexilamino-sepharosa, cromatografiada en una columna analítica de Bio-Gel A 5M. Las flechas indican la posición de los picos de las proteínas marcadoras. La actividad adenilato ciclasa eluye como un único pico que precede al de la  $\beta$ galactosidasa, con una  $K_{el}$  de 1.63, correspondiente a un radio de Stokes de 7.3 nm.

### III,3. ULTRACENTRIFUGACIONES EN GRADIENTES DE SACAROSA

Con el objeto de conocer el coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$ ) y el volumen específico parcial ( $\bar{v}$ ) de la enzima se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa hechos en  $H_2O$  y  $D_2O$ . Los resultados se muestran en la figura 32, en la curva de calibración inserta en dicha figura se graficó la distancia recorrida por cada proteína marcadora desde el borde superior del gradiente hasta la posición alcanzada, al finalizar la centrifuga -



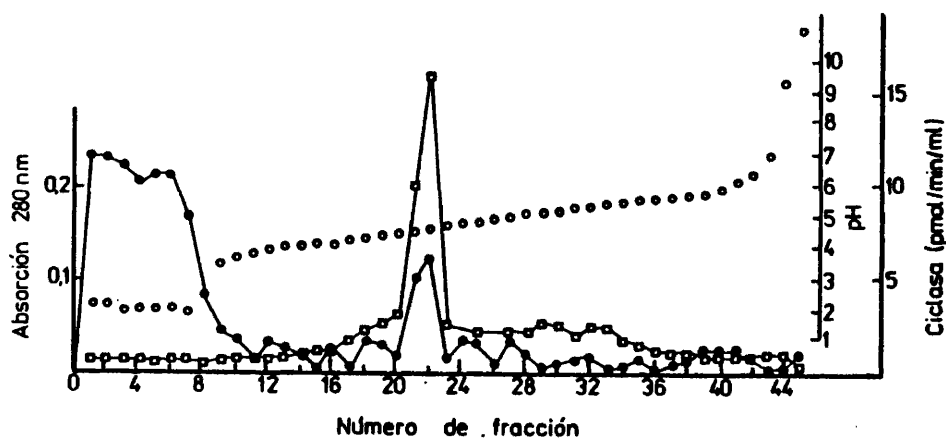


Figura 30. Electroenfoque en gradiente de sacarosa en rango de pH 4-6 de una preparación Bio-Gel de N. cra - ssa.

Se realizó en una columna de 110 ml de capacidad tal como se especifica en el apartado VIII,1 de "Materiales y Métodos". Se sembró en el centro del gradiente 1 ml de muestra (4-5 mg de proteína). Se aplicó una intensidad de corriente de 7 mA y un voltaje de 700 V, durante 48 h.

- (○) actividad de adenilato ciclasa
- (●) Proteína
- (○) valor de pH

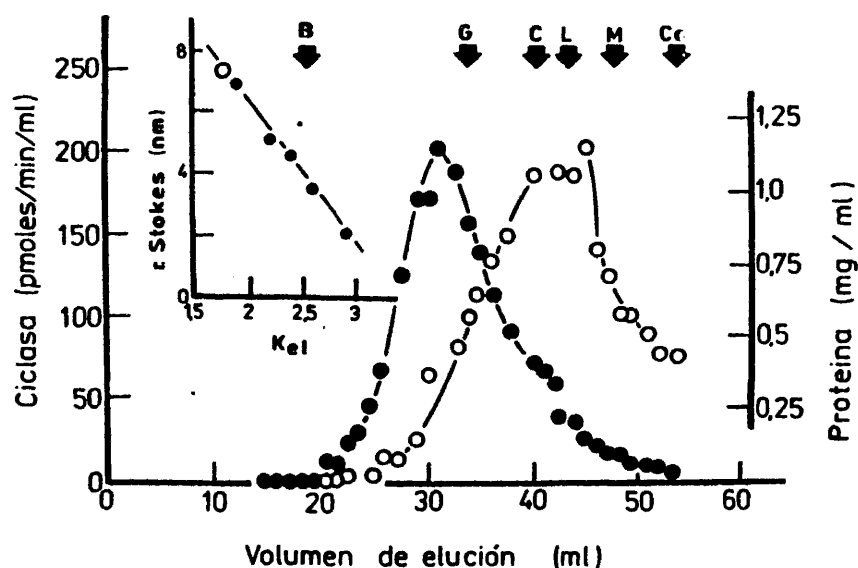


Figura 31. Filtración en columna de Bio-Gel A 5 m de una preparación de hexilamino-sepharosa de N. crassa.

(●) actividad de adenilato ciclasa. (○) Proteína. Las flechas indican la posición de elución de una suspensión de bacterias (B) o de las proteínas marcadoras galactosidasa (G); catalasa (C); lactato deshidrogenasa (L); malato deshidrogenasa (M) y citocromo c (Cc). El gráfico inserto muestra la relación entre los radios de Stokes y los  $K_{el}$  para la actividad de adenilato ciclasa (○) y para las proteínas marcadoras (●). La  $K_{el}$  está definida por el cociente entre los volúmenes de elución de la adenilato ciclasa o las proteínas marcadoras y el volumen de elución de la suspensión de bacterias (volumen de exclusión de la columna).

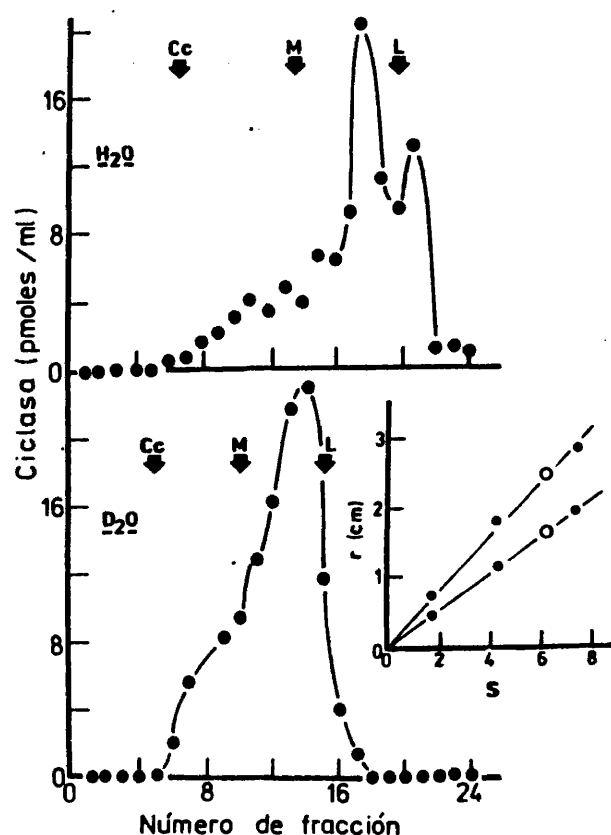


Figura 32. Centrifugaciones en gradientes de sacarosa de - una preparación hexilamino-sepharosa de N. crassa.

Los gradientes se realizaron en agua u óxido de deuterio. - Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: citocromo c (Cc), malato deshidrogenasa (M) y lactato deshidrogenasa (L). En el gráfico insertado se encuentra la relación entre los coeficientes de sedimentación (S) y la posición en los gradientes de la adenilato ciclasa (○) y las proteínas marcadoras (●). Las condiciones experimentales son descritas en "Materiales y Métodos".

CAPITULO III	PAGINA 175	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

ción (r), en función del coeficiente de sedimentación (S). Las constantes de sedimentación para la adenilato ciclasa fueron las mismas en ambos gradientes, presentado un valor de 6.25 S. Este hecho indica que la adenilato ciclasa y las proteínas marcadoras tienen, esencialmente, el mismo volumen específico parcial, 0.74 ml/g, que es característico de las proteínas globulares solubles.

Conociendo los valores del radio de Stokes, el coeficiente de sedimentación y el volumen específico parcial de la enzima, es factible estimar su peso molecular utilizando la fórmula planteada en el apartado IX,3 de "Materiales y Métodos". El valor calculado es de 200000 D. Además, se calculó una razón friccional de -1.65 para la enzima. La Tabla X resume los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la adenilato ciclasa de N. crassa.

TABLA X

Parámetros hidrodinámicos y moleculares de la adenilato ciclasa de N. crassa.

PARAMETRO	VALOR
$S_{20,w}$ (S)	6.2 0.1
$a$ (nm)	7.3 0.05
$\bar{v}$ (ml.g <sup>-1</sup> )	0.74
P.M. (D)	200000
$f/f_0$	1.65
$p^I$	4.6

CAPITULO III	PAGINA 176	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

#### III,4. DISCUSION

En la Tabla XI se muestran los parámetros hidrodinámicos y moleculares de distintas adenilato ciclasas, solubles y de membrana, de distintos organismos y tejidos. En relación a estos valores cabe señalar lo siguiente:

1. Se puede comprobar que existe una marcada diferencia entre - la adenilato ciclasa soluble de testículo y la enzima de Neurospora. Esta última presenta parámetros hidrodinámicos semejantes a las adenilato ciclasas asociadas a membrana.
2. Esta semejanza es particularmente interesante entre la adenilato ciclasa de Neurospora y la de la variante cyc<sup>-</sup> del linfoma S<sub>49</sub>, constituida sólo por el componente catalítico (C) (apartado VIII,4 Introducción) ya que no sólo se da coincidencia de tamaño sino también de comportamiento y características de la actividad enzimática, ésto es, ambas actividades son fuertemente dependientes del Mn<sup>+2</sup> e insensibles al fluoruro a la toxina del cólera y los nucleótidos de guanosina. Este hecho sugiere que la enzima de Neurospora, pudiera estar relacionada por el componente catalítico C de la adenilato ciclasa de eucariotes superiores (esta posibilidad se estudia en el apartado V de este capítulo de "Resultados y Discusión").
3. En esta Tesis se describe por primera vez, la purificación a homogeneidad de una adenilato ciclasa en un organismo eucariote inferior de tamaño similar al descrito para las adenilato ciclasas asociadas a membrana de células animales.
4. El hecho de que la adenilato ciclasa purificada de N. crassa mostrara una banda correspondiente a un tamaño de 65000 D. y que la enzima nativa posea un peso molecular de 200000 D., sugiere la posibilidad de que la adenilato ciclasa de N. crassa sea una proteína oligomérica, constituida por tres sub -

CAPÍTULO	III	PAGINA	177	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

TEJIDO	TESTICULO SOLUBLE	TESTICULO MEMBRANA	NEUROSPORA	RIÑON	CEREBRO	HIGADO	LINFOMA S <sub>49</sub>	LINFOMA S <sub>49</sub> cyc
Referen- cia	Kornblihtt (29)	Neer (299)	Esta Tesis	Neer (31)	Neer (33)	Stengel (35)	Gilman (38)	Gilman (38)
Peso mo- lecular	74000	190000	200000	159000	220000	180000	250000	190000
S <sub>20.W</sub> (S)	4.3	6.7	6.2	5.9	8.1	6.8	8.3	6.5
Radio de Stokes(nm)	3.9	6.8	7.3	6.2	7.0	7.0	7.1	7.1
$\bar{v}$ (ml/g)	0.74	0.73	0.74	0.74	0.79	0.82	0.78	0.76
$f/f_0$	1.4	1.6	1.65	1.6	1.5	1.5	1.6	1.8

TABLA XI

Propiedades hidrodinámicas de las adenilato ciclasas solubles y de membrana de distintos tipos de células eucariotes.

CAPITULO	III	PAGINA	178	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

unidades iguales de 65000 D. cada una.

5. El valor obtenido de la razón friccional ( $f/f_0$ ), 1.65, permite decir que esta enzima presenta hidratación y/o se aleja de la esfericidad, ya que dicho valor se aleja de la unidad.

#### IV. CINETICA DE LA ADENILATO CICLASA DE N. CRASSA

Flawiá y Torres (254) realizaron en 1972, un estudio cinético - con la adenilato ciclase asociada a membrana, en la mutante "slime" de N. crassa. Este estudio reveló fundamentalmente que:

1. El complejo Mn ATP es el sustrato efectivo de la enzima, actuando el ATP como inhibidor competitivo de la misma.
2. A concentración equimolecular de ATP y  $Mn^{+2}$  las curvas de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato, Mn ATP, son sigmoideas y tienden a ser hiperbólicas al ir aumentando la concentración del catión divalente libre sobre la de Mn ATP.
3. El  $Mn^{+2}$  actúa como activador sólo a baja concentración de Mn ATP.

#### IV,1 CINETICA DE LA FORMA SOLUBLE DE LA ADENILATO CICLASA DE N. CRASSA

Los estudios preliminares, mostraron, efectivamente, que la forma soluble de la adenilato ciclase, tiene las mismas propiedades que la forma asociada a membrana: es dependiente de  $Mn^{+2}$  para -

CAPITULO	III	PAGINA	179	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

expresar su actividad enzimática y la misma es insensible al -  
fluoruro, la toxina del cólera o los nucleótidos de guanosina.

En la figura 33, se muestran las representaciones de la activi -  
dad enzimática, en función de la concentración de ATP a diversas  
concentraciones de  $Mn^{+2}$ . Puede observarse que a concentraciones  
del nucleótido, por encima de las de  $Mn^{+2}$  la reacción enzimática  
está inhibida. Esto en principio puede deberse a que:

1. El ATP actúa como un inhibidor competitivo de la enzima, com-  
pitiendo con el sitio activo con el sustrato efectivo, esto  
es, el complejo Mn ATP.
2. La reacción enzimática requiere de  $Mn^{+2}$  libre y a mayores -  
concentraciones de ATP, el nucleótido se asocia con el ca -  
tión libre.

La primera de estas posibilidades, sería más lógica, teniendo en  
cuenta que aún en la condición extrema de ATP, 10 mM y  $Mn^{+2}$ , 0.25  
mM, la adenilato ciclase es activa. Por otra parte, con la enzi  
ma de la cepa "slime" de N. crassa se demostró, efectivamente, -  
que un análogo del ATP, el 5' AMP actúa como inhibidor competi  
vo de la reacción.

En la figura 34, se muestra la representación de la actividad en  
zimática en función de la concentración de Mn ATP, a diferentes  
concentraciones de  $Mn^{+2}$  en exceso sobre la concentración de Mn-  
ATP. Se puede deducir que cuando no existe  $Mn^{+2}$  en exceso, di -  
cha representación muestra un comportamiento sigmoideo con un -  
coeficiente de Hill de n: 2.5. A medida que se va aumentando la  
concentración de  $Mn^{+2}$  en exceso, sobre la de Mn ATP, las curvas  
tienden a ser hiperbólicas. Cuando la concentración de  $Mn^{+2}$  en  
exceso es de 0.25 mM, el coeficiente de Hill es de n: 1.3, y fi  
nalmente, cuando dicha concentración es de 0.5 mM el coeficiente  
de Hill es de n: 1.1. Paralelamente, la concentración de Mn ATP  
a la cual, la velocidad de la reacción es la mita de la máxima  
alcanzada, va disminuyendo de 1.2 mM cuando existe concentración



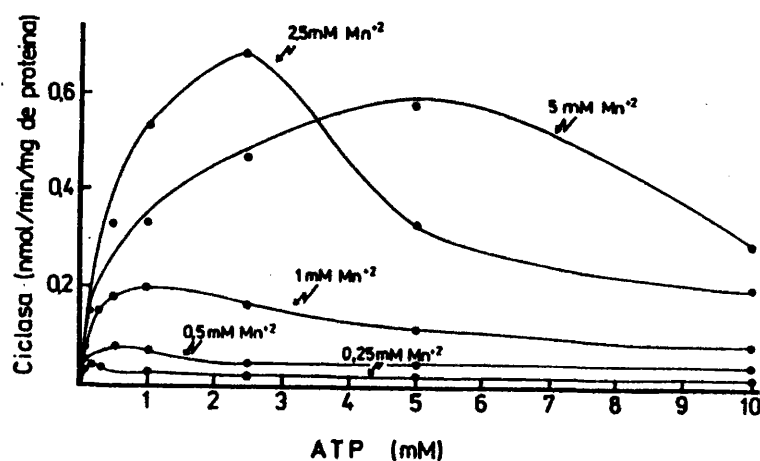


Figura 33. Actividad de adenilato ciclasa como una función de la concentración de ATP a diferentes concentraciones de  $Mn^{2+}$ .

La medida de la actividad se realiza tal como se especifica en el apartado V de "Materiales y Métodos". La mezcla de ensayo de la actividad enzimática contiene las concentraciones de ATP, indicadas en la abscisa y  $MnCl_2$  a las concentraciones que se señalan en la figura. El tiempo de incubación es de dos minutos.

CAPITULO	III	PAGINA	181	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

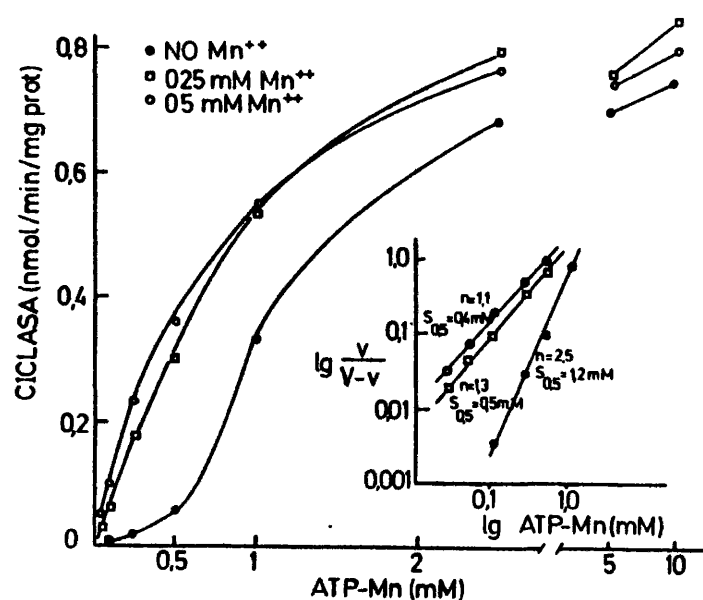


Figura 34. Actividad de adenilato ciclasa como una función de la concentración de Mn ATP a diferentes concentraciones de  $Mn^{++}$  en exceso. La mezcla para el ensayo de la actividad de adenilato ciclasa contiene las concentraciones de ATP y  $MnCl_2$  que se indican en la abscisa. Algunas mezclas contenían cantidades adicionales de  $MnCl_2$  a las concentraciones que se indican en la figura. Otras condiciones son, como se especifica en la figura 33.

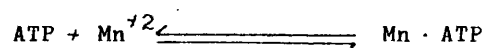
CAPITULO	III	PAGINA	182	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

equimolar de ATP y  $Mn^{+2}$ , hasta 0.4 mM cuando existe una concentración de  $Mn^{+2}$  en exceso de 0.5 mM. Por otra parte, el  $Mn^{+2}$  en exceso, sólo activa a baja concentración de sustrato.

Cabe destacar, que cuando los experimentos mostrados en la figura 34 se realizaron, en lugar de con la forma soluble de la adenilato ciclase, con la forma asociada a membrana, partiendo de un sedimento de 105000 x g ( $P_{105}$ ) de N. crassa, StL 74, los resultados obtenidos fueron muy similares, estando de acuerdo en ambos casos, en líneas generales, con lo establecido previamente por Flawiá y Torres (254) a partir de la adenilato ciclase asociada a membrana de la cepa "slime" de N. crassa (Tabla XII).

Los resultados mostrados en la figura 34 pueden interpretarse de diferentes maneras:

1. La enzima tiene una dependencia cooperativa del sustrato, actuando el  $Mn^{+2}$  libre, como un regulador positivo. Esto vendría apoyado por la naturaleza oligomérica postulada para la enzima.
2. A concentración equimolar de ATP y  $Mn^{+2}$  y según el equilibrio:



la mayor proporción del ATP se encuentra en forma complejada con el catión, sin embargo puede existir una pequeña proporción de ATP en forma no complejada, actuando según lo expuesto anteriormente, como inhibidor de la reacción. Esto podría explicar la forma sigmoidea de la curva, y el hecho de que al aumentar la concentración de  $Mn^{+2}$  libre, la enzima tenga un comportamiento hiperbólico.

El hecho de que el  $Mn^{+2}$  active la reacción sólo a bajas concentraciones del sustrato, permite suponer que se de esta última posibilidad.

CAPITULO	III	PAGINA	183	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

#### IV,2 ESTUDIO CINETICO DE LA ADENILATO CICLASA EN CONIDIAS PERMEABILIZADAS

En la figura 35 se muestra la representación de la actividad de la adenilato ciclasa en función de la concentración de Mn ATP en conidias de N. crassa, StL 74, permeabilizadas (apartado IV, "Materiales y Métodos"). Se puede deducir que el comportamiento de la enzima es el mismo que el de la forma soluble o el de la forma asociada a membrana, en el sentido de que a concentración equimolar de ATP y  $Mn^{+2}$ , la curva de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato es sigmoidea, con un coeficiente de Hill de  $n: 2.5$ . Al añadir  $Mn^{+2}$  en exceso sobre la concentración de sustrato, el coeficiente de Hill disminuye.

Las conidias permeabilizadas constituyen un sistema ideal para la realización de estudios cinéticos debido a que las enzimas se encuentran en su entorno biológico natural. Las observaciones antes mencionadas, permiten concluir que el proceso de homogeneización y extracción de la adenilato ciclasa no afecta, aparentemente, la funcionalidad de la misma, siendo perfectamente válidos los resultados obtenidos. En la Tabla XII, se resumen los parámetros cinéticos, obtenidos con las diferentes preparaciones enzimáticas.

#### IV,3 DISCUSION

Los estudios cinéticos presentados sugieren las siguientes observaciones:

1. Existe una similitud en cuanto al comportamiento y parámetros cinéticos entre las diferentes preparaciones de la adenilato ciclasa de N. crassa, lo que aboga en favor de la existencia de una única forma molecular de la enzima, la

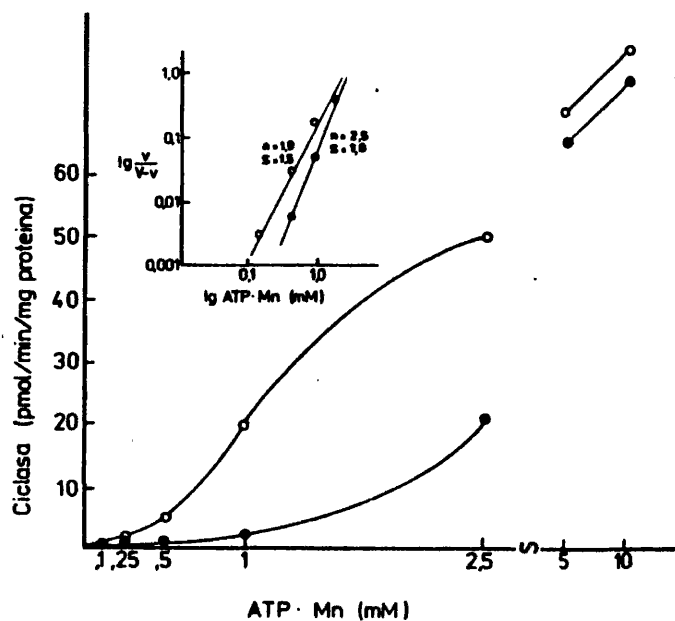


Figura 35. Actividad de adenilato ciclase como una función de la concentración de ATP. Mn. sin (●) y con (o) 0.5 mM de Mn<sup>2+</sup> en exceso. La mezcla para el ensayo de la actividad de la adenilato ciclase contiene las concentraciones de ATP y Mn Cl<sub>2</sub>, que se indican en la abscisa, y en su caso 0.5 mM de MnCl<sub>2</sub>.<sup>2</sup> Cada ensayo se realizó con 20  $\mu$ l de una suspensión de cónidias permeabilizadas (3 mg de proteína/ml) obtenidas, tal como se especifica en "Materiales y Métodos". La mezcla de incubación contenía NaF 5 mM como inhibidor de la ATPasa, el tiempo de incubación es de 10 minutos.

CAPITULO	III	PAGINA	185	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

PREPARACION ENZIMATICA	LIGANDO	Mn <sup>+2</sup> (en exceso) (mM)	L0.5	n
Forma soluble, preparación hexilamino-sepharosa. cepa StL 74	Mn.ATP	-	1.2	2.5
		0.25	0.5	1.3
		0.50	0.4	1.1
Forma asociada a membrana, sedimento 105000xg cepa StL 74.	Mn.ATP	-	1.8	2.8
		0.5	0.8	1.7
Forma asociada a membrana sedimento 105000 xg cepa "slime" (FGSC1118) Flawiá <u>et al</u> (264)	Mn.ATP	-	1.5	1.9
		0.25	1.0	1.0
		0.50	1.1	1.0
Conidias permeabilizadas cepa StL 74	Mn.ATP	-	1.9	2.5
		0.50	1.5	1.9

TABLA XII

Parámetros cinéticos de la adenilato ciclasa de N. crassa obtenidos en diferentes condiciones experimentales.

CAPITULO	III	PAGINA	186	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

cual puede encontrarse en forma soluble o asociada a membrana.

2. La similitud funcional existente entre la forma soluble y la forma asociada a membrana sugiere que el entorno lipídico de la membrana no debe ser un factor importante en la expresión de la actividad de la adenilato ciclasa en N. crassa.
3. A pesar de que de los resultados obtenidos no puede concluirse fehacientemente la existencia de un sitio regulador para el  $Mn^{+2}$ , los mismos sugieren que los niveles intracelulares de cAMP en N. crassa pueden venir coordinados por la relación  $ATP/Mn^{+2}$ .
4. Los resultados obtenidos con las conidias permeabilizadas, semejantes a las correspondientes de las formas solubles y asociada a membrana, permiten suponer que los resultados obtenidos con estas preparaciones son válidos en el sistema "in vivo".

Silveira et al (246) y Gomes et al (227) realizaron estudios cinéticos de la adenilato ciclasa dependiente de  $Mn^{+2}$  de T. cruzi y B. emersonii, respectivamente, siendo los resultados obtenidos por estos autores, semejantes a los descritos para la enzima de N. crassa.

Son pocos los estudios cinéticos existentes sobre la actividad basal de las adenilato ciclasas en presencia de  $Mg^{+2}$  de organismos eucariotes superiores (300). Esto se debe a dos razones principalmente: la primera de ellas surge de la débil actividad basal de la enzima, y la segunda por la presencia de la ATPasa en las preparaciones de membrana, donde, generalmente, se ensaya la actividad de adenilato ciclasa. Sin embargo, los estudios existentes han puesto de manifiesto características similares a las comentadas para la enzima de N. crassa, esto es:

- el verdadero sustrato de la enzima es el complejo  $Mg.ATP$

CAPITULO III	PAGINA 187	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

- el ATP en exceso sobre la concentración de  $Mg^{+2}$  actúa como inhibidor de la reacción enzimática.
- existen evidencias sobre la existencia de un sitio regulador para el  $Mg^{+2}$  (300, 301).

Esto lleva a considerar que las características generales de la catálisis enzimática basal de las adenilato ciclasas, ya usen - Mg.ATP o Mn.ATP como sustrato, son muy similares.

#### V. EXPERIMENTOS DE RECONSTITUCION DEL SISTEMA ADENILATO CICLASA SENSIBLE A HORMONA CON LA ENZIMA DE N. CRASSA Y EL COMPONENTE REGULADOR DE ERITROCITO DE PAVO

A través de diferentes enfoques experimentales, se ha llegado - hoy día a asumir que el sistema adenilato ciclasa sensible a hormonas, está constituido además de por el receptor, al menos por dos componentes, uno denominado N o componente regulador, y otro denominado C o componente catalítico (apartado VIII, Introduc - ción).

Los estudios de Ross y Gilman (38), usando diferentes líneas celulares del linfoma  $S_{49}$ , con disfuncionalidades en alguno de los componentes del sistema adenilato ciclasa sensible a hormona, han revelado importantes propiedades de cada uno de los componentes del mismo.

La variante  $cyc^{-}$  del linfoma  $S_{49}$  sólo posee el componente catalítico C, el componente regulador está funcionalmente ausente. Dicho componente catalítico sólo manifiesta su actividad enzimática en presencia de  $Mn^{+2}$ , ésta es insensible al fluoruro, la tox



CAPITULO III	PAGINA 188	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

na del cólera o los nucleótidos de guanosina, y tiene un peso molecular de alrededor de 200000 D. Todas estas propiedades son coincidentes con las de la adenilato ciclasa de N. crassa. Cabe de esta forma la posibilidad de que la adenilato ciclasa de N. crassa y, subsecuentemente, las demás adenilato ciclasas insensibles a los efectores mencionados, estén relacionadas de una forma u otra, con el componente catalítico C de la enzima de organismos eucariotes superiores.

Ross y Gilman demostraron (113) que al añadir el componente regulador N de membranas de células del linfoma S<sub>49</sub> a una suspensión de membranas de la variante cyc<sup>-</sup>, conteniendo el componente catalítico C, se reconstituía la actividad de adenilato ciclasa dependiente de Mg<sup>+2</sup> y que la misma era sensible a la activación hormonal, fluoruro y nucleótidos de guanosina, es decir, se reconstituyen las características que el componente regulador confiere al sistema adenilato ciclasa.

La adenilato ciclasa de espermatozoides es una enzima asociada a membrana y al igual que la enzima de la variante cyc<sup>-</sup> o de la enzima de N. crassa, es mucho más activa en presencia de Mn<sup>+2</sup> que de Mg<sup>+2</sup>, además es igualmente insensible al fluoruro, la toxina del cólera y los nucleótidos de guanosina (302, 303). Stengel et al., demostraron recientemente (304), que la enzima de espermatozoide podía interaccionar con el componente N del sistema adenilato ciclasa de eritrocito humano, siendo la actividad enzimática en el sistema reconstituido sensible a los efectores antes mencionados. Igualmente, pudieron detectar activación hormonal, debido a la participación en el sistema reconstituido de receptores de prostaglandina de eritrocito.

En este apartado, se detallan las experiencias sobre la posibilidad de reconstituir con la adenilato ciclasa de N. crassa (presumible componente C) y el componente regulador N de eritrocito de pavo, un sistema adenilato ciclasa con características similares al de eucariotes superiores.

Los detalles experimentales se describen en el apartado XIII de

CAPITULO III	PAGINA 189	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

"Materiales y Métodos". Un esquema general del proceso seguido para la reconstitución se muestra en la figura 36.

En la Tabla XIII, se muestran las actividades de adenilato ciclase de las diferentes preparaciones de membranas empleadas en los ensayos de reconstitución. Es importante destacar que el extracto en detergente (colato o digitonina) de las membranas de eritrocito, fuente del componente regulador N para la reconstitución, no posee actividad de adenilato ciclase, por haberse inactivado el componente catalítico correspondiente. La actividad de adenilato ciclase en la suspensión de membranas de eritrocito es sensible a diversos efectores, particularmente la medida en presencia de  $Mg^{+2}$ , sin embargo, la actividad adenilato ciclase en membranas de N. crassa, como fué anteriormente especificado, sólo se expresa en presencia de  $Mn^{+2}$  (la actividad en presencia de  $Mg^{+2}$  es prácticamente nula) y la misma es insensible a los efectores ensayados.

#### V.1. REQUERIMIENTOS PARA LA OBTENCION DE SISTEMA RECONSTITUIDO

Puede observarse en la Tabla XIV que la reconstitución de la actividad de adenilato ciclase medida en presencia de  $Mg^{+2}$ , se produce cuando se adicionan las membranas de Neurospora StL 74, con el extracto de membranas de eritrocito. Cuando en lugar de la adenilato ciclase asociada a membrana, se usaron las formas solubles tanto de testículo como de Neurospora, la reconstitución no se produce, esto sugiere la necesidad del entorno lipídico de la membrana para que se produzca una reconstitución efectiva del sistema.

Como un experimento control se realizó el ensayo de reconstitución con membranas de la cepa FGSC 488 de N. crassa, portadoras de la mutación cr-1, deficiente en actividad de adenilato ciclase.

CAPITULO III	PAGINA 190	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

#### ESQUEMA DE RECONSTITUCION

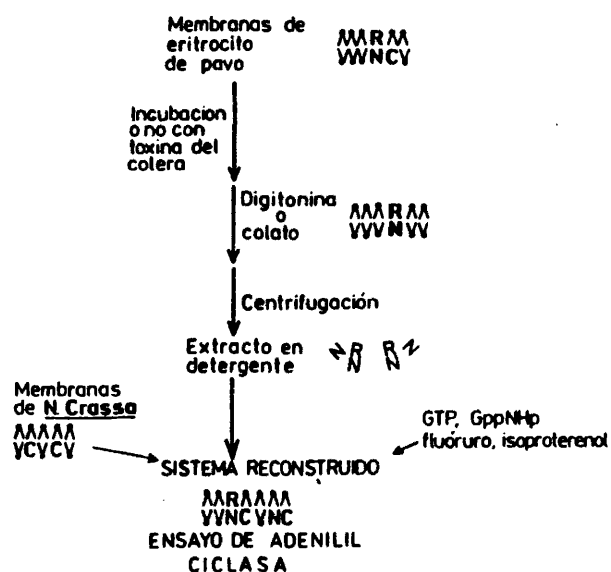


Figura 36. Esquema general de reconstitución de actividad de adenilato ciclasa, dependiente de  $Mg^{+2}$ , partiendo de la enzima de *Neurospora crassa* y un extracto en detergente de membranas de eritrocito de pavo. R: Receptor, N: componente regulador, C: componente catalítico.

CAPITULO	III	PAGINA	191	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA (pmol/min/mg de proteína)

LIGANDO (M)	ERITROCITO				NEUROSPORA	
	MEMBRANAS		EXTRACTO EN DETERGENTE		MEMBRANAS	
	Mn <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Mn <sup>+2</sup>	o Mg <sup>+2</sup>	Mn <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>
Ninguno -	21.1	6.3		0.06	85.7	0.09
Isoprotere-nol 10 <sup>-7</sup>	27.2	11.4		0.06	91.1	0.09
10 <sup>-6</sup>	26.3	22.2		0.06	92.1	0.09
10 <sup>-5</sup>	26.9	25.7		0.06	92.5	0.06
GppNHp 10 <sup>-6</sup>	29.9	9.4		0.08	90.7	0.07
Isoprotere-nol 10 <sup>-6</sup>						
- GppNHp 10 <sup>-6</sup>	30.0	31.1		0.05	92.9	0.06
Fluoruro 10 <sup>-2</sup>	332.0	552.0		0.06	92.9	0.09

TABLA XIII

Actividades de adenilato ciclasa, medidas en presencia de Mg<sup>+2</sup> o Mn<sup>+2</sup>, en membranas de eritrocito de pavo, en extractos en detergente (colato) de membranas de eritrocito y en membranas de N. - crassa. Las mezclas de reacción contienen 190,125 y 425  $\mu$ g de proteína, respectivamente.

CAPITULO	III	PAGINA	192	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

SISTEMA BIOLOGICO	ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA (pmol/min/mg de proteína)			COMPONENTES EN LA MEZCLA			
	BASAL	ISOPROTERENOL + GppNHp	FLUORURO	C	R	H	MEMBRANA
MEMBRANAS N. CRASSA Copa StL74	0,09	0,06	0,09	+	-	-	+
MEMBRANAS N. CRASSA Cr-1	0,06	0,05	0,06	-	-	-	+
ADENILIL CICLASA Soluble N. CRASSA	0,07	0,06	0,06	+	-	-	-
EXTRACTO EN DETERGENTE DE ERITROCITO	0,06	0,05	0,06	-	+	+	-
MEMBRANAS N. CRASSA Copa StL74 + EXTRACTO EN DETERGENTE DE ERITROCITO	3,0	19,0	90,0	+	+	+	+
MEMBRANAS N. CRASSA cr-1 + EXTRACTO EN DETERGENTE DE ERITROCITO	0,06	0,06	0,07	-	+	+	+
ADENILIL CICLASA soluble N. CRASSA + EXTRACTO EN DETERGENTE DE ERITROCITO	0,06	0,05	0,06	+	+	+	-
ADENILIL CICLASA soluble TESTICULO + EXTRACTO EN DETERGENTE DE ERITROCITO	0,06	0,05	0,05	+	+	+	-

Tabla XIV. Requerimientos para la obtención de un sistema de reconstitución efectivo.

Las mezclas de reacción de membranas de *N. crassa*, StL 74 membranas de *N. crassa*, cr-1, extracto en colato de eritrocito, adenilato ciclasa soluble de *N. crassa* o adenilato ciclasa soluble de testículo, contienen 420, 425, 125, 300 o 190  $\mu$ g de proteína, respectivamente. Los ensayos de actividad de adenilato ciclasa fueron realizados en presencia de  $Mg^{+2}$ . Las concentraciones de Isoproterenol GppNHp y fluoruro en las mezclas fueron  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-2}$  M, respectivamente.

CAPITULO III	PAGINA 193	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

sa. Como muestra la Tabla XIV, no se produjo reconstitución en tal ensayo, lo que prueba que la misma se debe a la interacción del componente regulador N existente en el extracto de detergente de las membranas de eritrocito y la adenilato ciclase de Neurospora, descartándose, además, la posibilidad de que la aparición de actividad de adenilato ciclase en presencia de  $Mg^{+2}$  en los ensayos de reconstitución se debiera a una reactivación del componente catalítico C de eritrocito, al interaccionar con lípidos de la membrana de Neurospora (305).

Finalmente, cabe destacar en esta experiencia, que la actividad enzimática en la mezcla reconstituida en forma efectiva, es sensible al efecto del fluoruro y del isoproterenol más GppNHp, tal como se observa en los sistemas adenilato ciclase sensible a hormonas en organismos eucariotes superiores (306). La actividad del sistema reconstituido en presencia de fluoruro es del mismo orden que la medida en membranas de N. crassa en presencia de  $Mn^{+2}$  (Tabla XIII), lo que sugiere que en ambos casos la enzima está activada en un nivel máximo.

#### V,2. VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASE EN EL SISTEMA RECONSTITUIDO EN PRESENCIA DE DIVERSOS EFECTORES

En la figura 37 se muestra la variación de la actividad de adenilato ciclase, con el tiempo, en el sistema reconstituido a partir de un extracto en colato de membranas de eritrocito no tratadas previamente con toxina del cólera. Se puede observar que se producen efectos estimuladores con fluoruro o con isoproterenol más GppNHp.

En la figura 38 se muestra una experiencia similar a la anterior pero en la que las membranas de eritrocito fueron tratadas previamente con toxina del cólera. En este caso, la actividad de

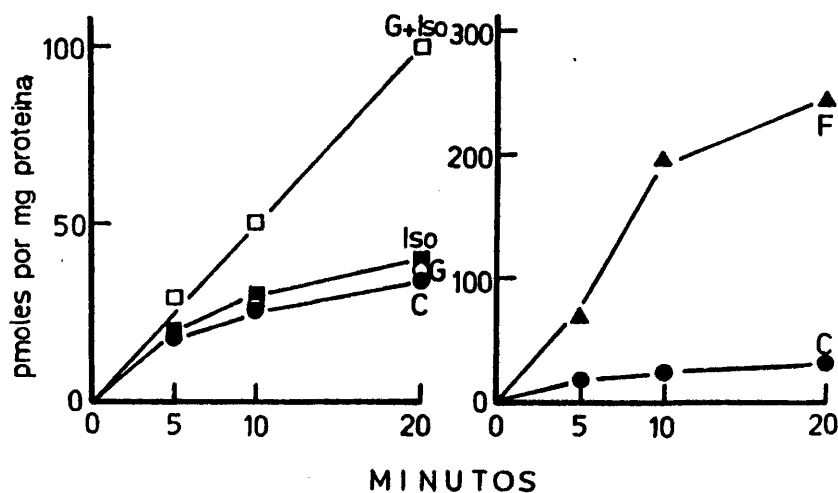


Figura 37. Medida de la actividad de adenilato ciclasa en función del tiempo en un sistema reconstituido a partir de membranas de *N. crassa* StL 74 (215  $\mu$ g de proteína) y un extracto en colato de membranas de eritrocito (125  $\mu$ g de proteína) no tratadas con toxina del cólera. La mezcla de reacción fué suplementada con : nada (●), GppNHp (○), Isoproterenol (■), Isoproterenol más GppNHp (□) o fluoruro (▲). Las concentraciones de Isoproterenol, GppNHp o fluoruro en las mezclas fueron:  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-2}$ , respectivamente.

CAPITULO	III	PAGINA	195	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

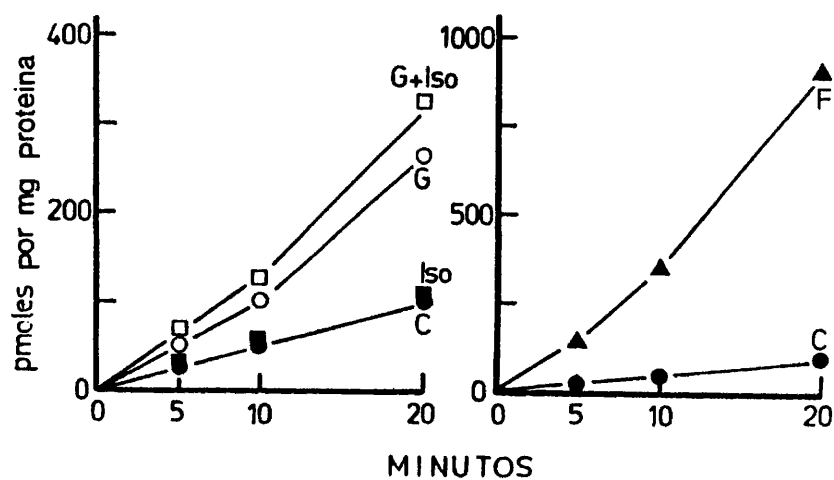


Figura 38. Medida de la actividad de adenilato ciclasa en función del tiempo en un sistema reconstituido a partir de membranas de *N. crassa* StL 74 (230  $\mu$ g de proteína) y un extracto en colato de membranas de eritrocito (125  $\mu$ g de proteína) previamente tratadas con toxina del cólera, tal como se especifica en el apartado XII,1 de "Materiales y Métodos". Los símbolos son iguales que en la figura 37.



CAPITULO	III	PAGINA	196	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

adenilato ciclase en el sistema reconstituido es comparativamente mayor que en el caso anterior. Puede observarse que se producen los efectos estimuladores antes mencionados, pero además el GppNHp es de por sí, capaz de estimular al sistema.

Cuando las membranas de eritrocito no son previamente tratadas con toxina del cólera, no se produce activación por Isoproterenol o por GppNHp, si son ensayados por separado, sin embargo, se produce una visible activación cuando la mezcla de ensayo contiene ambos efectores (figura 38). Esto sugiere que para que en dichas circunstancias se produzca activación deba existir un complejo ternario: Receptor-Componente N-Componente C, debido a la necesidad de la acción hormonal para favorecer el recambio del GDP u otros nucleótidos que puedan estar asociados al componente regulador. En las membranas de eritrocito de por sí la activación por GppNHp requiere también de la presencia hormonal (120).

En el caso de que las membranas de eritrocito sean previamente tratadas con la toxina el GppNHp es de por sí capaz de estimular el sistema reconstituido, esto supone considerar que no es necesaria la acción hormonal para favorecer la asociación del nucleótido al componente regulador, es decir, la activación en tales circunstancias puede explicarse por la formación del complejo binario: Componente N-Componente C, no obstante el isoproterenol potencia dicho efecto.

Es lógico considerar, por otra parte, que la estimulación hormonal en el sistema reconstituido, viene mediada por los receptores adrenérgicos de eritrocito, los cuales son solubilizados conjuntamente con el componente regulador, dada la afinidad existente entre ambos componentes, de hecho se ha demostrado la existencia de complejos: Receptor-Componente N en la membrana de eritrocito de pavo, mediante ensayos "in situ" (39).

CAPITULO	III	PAGINA	197	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

### V,3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE ERITROCITO, - ISOPROTERENOL Y FLUORURO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CI CLASA EN EL SISTEMA RECONSTITUIDO

En la figura 39 se muestra la relación entre la actividad de adenilato ciclase y la cantidad de extracto en colato de las membranas de eritrocito en la mezcla de reconstitución. Tanto en presencia de isoproterenol más GppNHp, como de fluoruro, el sistema tiende a saturarse al aumentar la concentración de extracto en la mezcla de reconstitución, sin embargo, la actividad basal es prácticamente proporcional a la cantidad de extracto añadida en el rango estudiado.

En la figura 40 se muestra la actividad de adenilato ciclase en el sistema reconstituido, ensayada en presencia de GppNHp  $10^{-7}$  M como una función de la concentración de isoproterenol. El sistema exhibe una curva dosis-respuesta similar al sistema homólogo estudiado en membranas de eritrocito (307). La estimulación por isoproterenol es un fenómeno saturable, produciéndose la mitad de la estimulación máxima a una concentración de isoproterenol de  $10^{-7}$  M, similar al descrito en membranas de eritrocito de pavo (307).

La dependencia de la actividad de adenilato ciclase de la concentración de fluoruro en el sistema reconstituido, se muestra en la figura 41. La respuesta a concentraciones crecientes del anión, es similar a la descrita para el sistema adenilato ciclase de hígado (308).

### V,4 RECONSTITUCION DE ACTIVIDAD ADENILATO CICLASE DEPENDIENTE DE $Mg^{+2}$ EN MEMBRANAS DE N. CRASSA USANDO UN EXTRACTO DE MEMBRANAS DE ERITROCITO PRETRATADAS CON TOXINA DEL COLERA Y $^{14}C$ NAD

CAPITULO	III	PAGINA	198	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

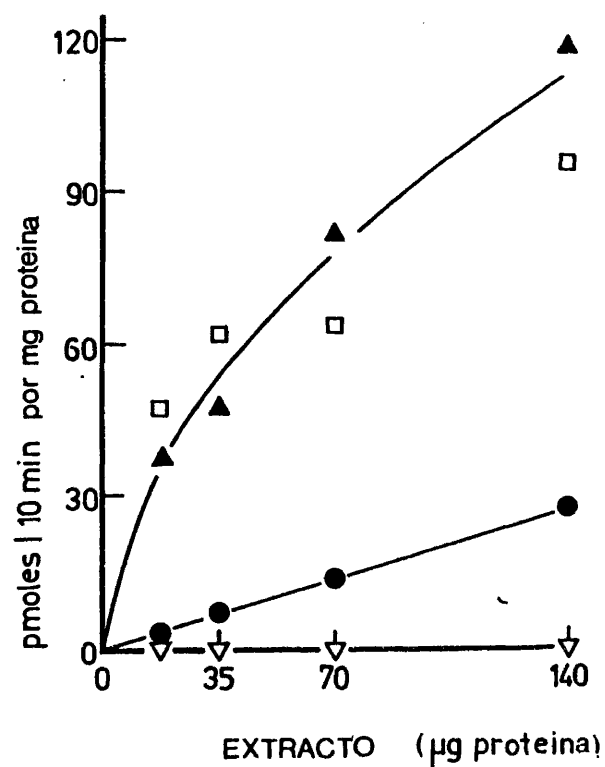


Figura 39. Actividad de adenilato ciclasa en función de la concentración del extracto en colato de las membranas de eritrocito en la mezcla de reconstitución, constituida por membranas de *N. crassa* StL 74 (215 μg de proteína) y cantidades variables de un extracto en colato de membranas de eritrocito, no tratadas con toxina del cólera. Otras condiciones y símbolos como en la figura 37.

CAPITULO	III	PAGINA	199	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

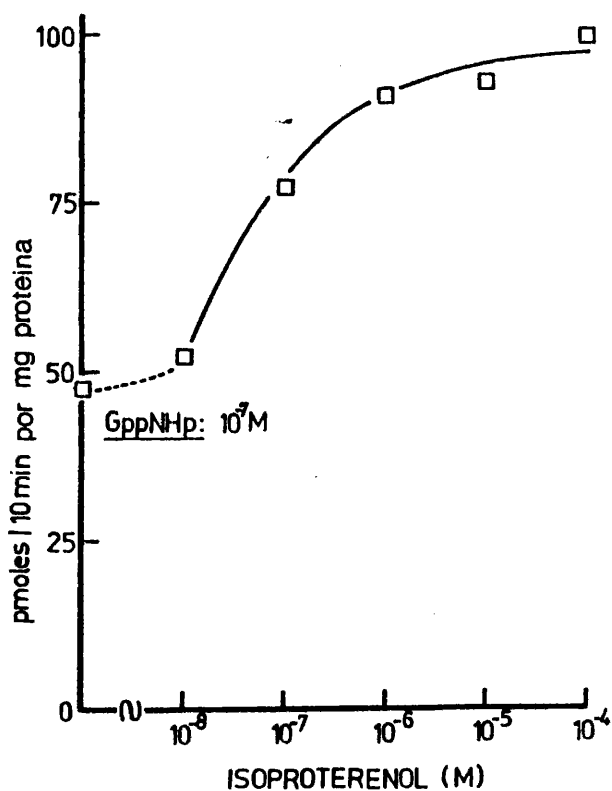


Figura 40. Actividad de adenilato ciclasa en un sistema reconstituido como una función de la concentración de isoproterenol. Membranas de *N. crassa* StL 74 (215  $\mu$ g de proteína) se mezclaron con un extracto en colato de membranas de eritrocito (120  $\mu$ g de proteína) no tratadas con toxina del cólera. La mezcla de ensayo se suplementó con GppNHp  $10^{-7}$  M y concentraciones variables de isoproterenol. El tiempo de incubación fué de 10 minutos.

CAPITULO	III	PAGINA	200	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

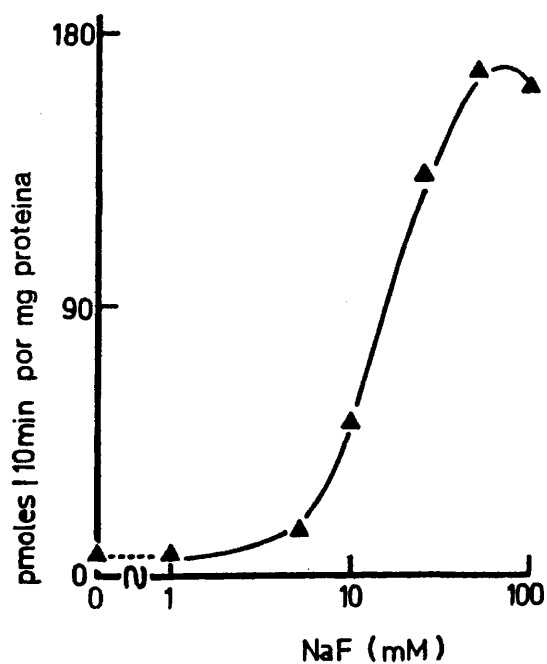


Figura 41. Actividad de adenilato ciclasa en un sistema reconstituido como una función de la concentración de fluoruro. Membranas de *N. crassa* StL 74 (250  $\mu$ g de proteína) se mezclaron con un extracto en colato de membranas de eritrocito (100  $\mu$ g de proteína) no tratadas con toxina del cólera. La mezcla de ensayo se suplementó con concentraciones variables de NaF. El tiempo de incubación fué de 10 minutos.

CAPITULO	III	PAGINA	201	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

Con el fin de verificar que el proceso de reconstitución se debe a la interacción del componente N de eritrocito con la adenilato ciclasa de Neurospora, se trataron las membranas de eritrocito - con toxina del cólera y [ $^{14}\text{C}$ ] NAD , tal como se especifica en el apartado XII,1 de "Materiales y Métodos", de esta forma el componente N se "marca" específicamente con  $^{14}\text{C}$ , debido a su ADP ribosilación en tales condiciones (apartado VII, Introducción). A continuación, se solubilizaron las membranas con digitonina, lo que origina la inactivación del componente C. El extracto correspondiente se aplicó a una columna de Ultrogel AcA34 (apartado XII,3 "Materiales y Métodos"). En la figura 42, se muestra el perfil de elución de dicha cromatografía. Se observó un sólo pico de radiactividad (componente N marcado con  $^{14}\text{C}$ ) correspondiente a un peso molecular de 30-35000 D. Cada fracción se ensayó en un sistema de reconstitución con membranas de N. crassa y se midió actividad de adenilato ciclasa en presencia de  $\text{Mg}^{+2}$ . Las fracciones en las que se detectó actividad enzimática en tales condiciones, coinciden con la presencia de radiactividad, lo que demuestra que la reconstitución del sistema adenilato ciclasa se debe a la interacción del componente regulador N de eritrocito y la enzima de Neurospora.

## V,5 DISCUSION

En este apartado se demuestra que la adenilato ciclasa de Neurospora es capaz de interaccionar con el componente regulador N de eritrocito de pavo, conformando un sistema adenilato ciclasa con las mismas propiedades que el de organismos eucariotes superiores.

La base de tal demostración se puede resumir en las siguientes observaciones:

CAPITULO	III	PAGINA	202	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

1. La reconstitución no se produce, si en lugar de las membranas de N. crassa StL 74, se emplean las de la variante cr-1, deficiente en actividad adenilato ciclasa, lo que prueba que para la reconstitución se requiere de la adenilato ciclasa de Neurospora y al mismo tiempo que la aparición de actividad adenilato ciclasa en presencia de  $Mg^{+2}$  en el sistema reconstituido, no se debe a una reactivación del componente C de eritrocito por un efecto inespecífico de lípidos de membrana (305)(Tabla XIV).
2. La reconstitución coincide con el pico de radiactividad después de someter a filtración en gel un extracto de eritrocito previamente marcado con toxina del cólera y  $[^{14}C]$  NAD. Este tratamiento "marca" preferentemente el componente N por una reacción de ADPribosilación (figura 42)(apartado VII, Introducción).
3. La más directa evidencia de la reconstitución es la aparición de actividad adenilato ciclasa dependiente de  $Mg^{+2}$  y el hecho de que la misma pueda ser modulada por los mismos efectores y de una forma similar al sistema homólogo.

En la figura 43 se esquematiza el posible "encuentro" y asociación entre el componente regulador N y la adenilato ciclasa de Neurospora(componente catalítico C), según las consideraciones del modelo de Cassel y Selinger (apartado VI, Introducción).

De las figuras 37 y 38 se puede destacar que la toxina del cólera al bloquear la actividad GTPasa y de esta forma una vía de inactivación del complejo activado  $N_{GTP} \cdot C$  (figura 43), mantiene al sistema en un estado activo, este hecho queda reflejado en los resultados obtenidos en la medida de que el sistema reconstituido exhibe una mayor actividad basal a partir de un extracto de membranas de eritrocito pretratadas con la toxina.

Según el modelo representado en la figura 43, la acción hormonal se requiere para el recambio del GDP por el GTP en el componente

CAPITULO III	PAGINA 203	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

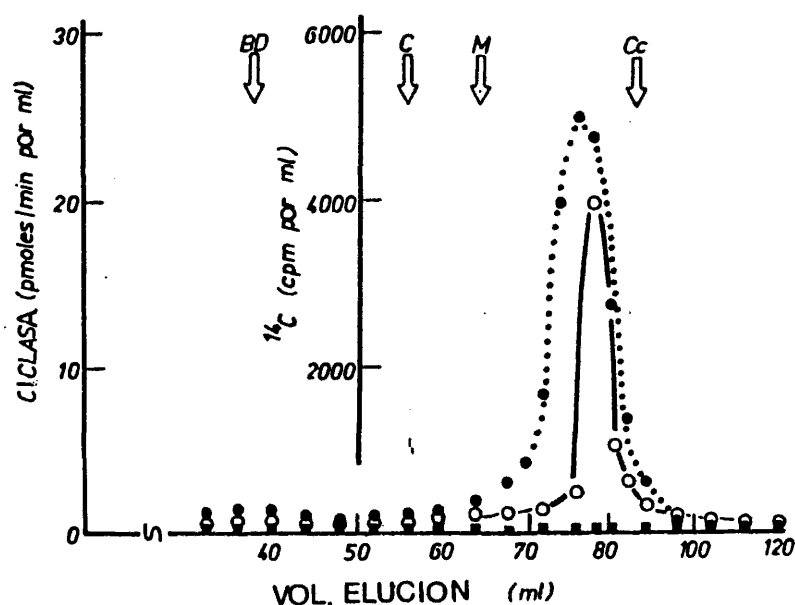


Figura 42. Perfil de elución de una cromatografía en Ultro gel Aca34 de un extracto en digitonina al 1 % de membranas de eritrocito, previamente tratadas con toxina del cólera y  $^{14}\text{C}$  NAD, tal como se especifica en el apartado XII,1 de "Materiales y Métodos".

Se aplicó 1ml de muestra (5-7 mg de proteína) a una columna con un lecho de gel de 1.25 x 53 cm, equilibrada con Tris-HCl 15 mM pH: 7.4, conteniendo EDTA 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  15 mM, digitonina 0.1 %. La elución se realizó con el mismo tampón a un flujo de 0.8 ml/min, y se recogieron fracciones de 4 ml.

Se midió en cada fracción  $^{14}\text{C}$  (●) y actividad de adenilato ciclasa en presencia de  $\text{Mg}^{+2}$  (O) en una mezcla suplementada con 5 l de una suspensión de membranas de *N. crassa* (12 mg de proteína/ml). Las flechas indican la posición del azul de extrano (AD), catalasa (C), malato deshidrogenasa (M) y citocromo c (Cc).



CAPITULO III	PAGINA 204	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

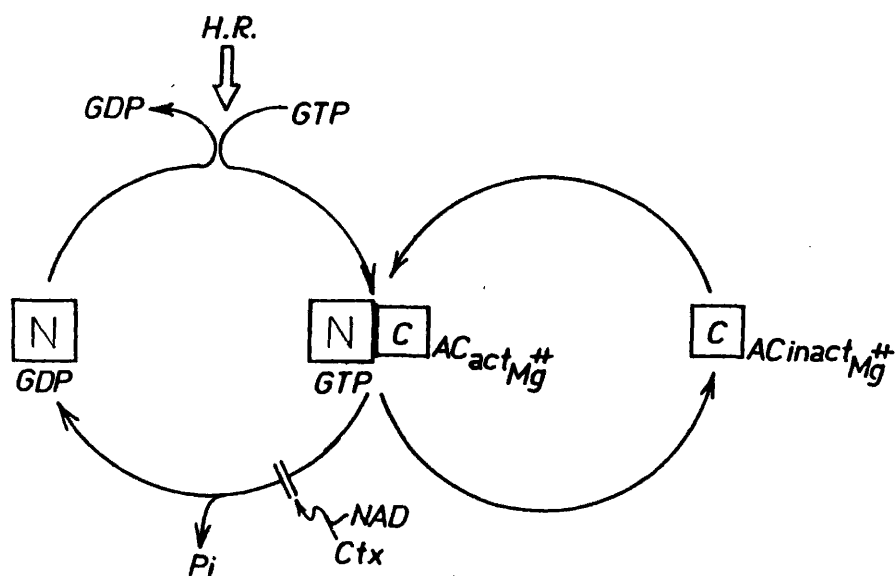


Figura 43. Asociación entre el componente regulador y el componente catalítico de la adenilato ciclasa según el modelo de Cassel y Selinger (apartado VI, Introducción).

CAPITULO III	PAGINA 205	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

regulador, de esta forma favorece la reactivación del sistema. - Cuando las membranas de eritrocito no son tratadas con la toxina la activación por nucleótido de guanosina se produce sólo en presencia de Isoproterenol, ésto, como ya se comentó se debe a la presencia de GDP u otros nucleótidos fuertemente asociados al componente regulador, los que impiden la "entrada" del nucleótido con efecto activador, GTP o GppNHp (309). La hormona según el modelo de Cassel y Selinger, facilita este recambio por un efecto heterotrópico negativo. Sin embargo, si las membranas han sido tratadas previamente con la toxina no se requiere del efecto hormonal. Este resultado apoya la hipótesis existente sobre la posibilidad de que la toxina no sólo inhiba la actividad GTPasa, sino que, además, favorece el recambio de nucleótidos de guanosina del sitio regulador en el componente N. El mecanismo debe ser distinto del inducido por la hormona ya que de hecho el Isoproterenol es capaz de estimular la actividad de adenilato ciclasa en presencia de GppNHp a partir de membranas pretratadas con la toxina (figura 38).

Los resultados obtenidos en este apartado constituyen la primera evidencia de que la adenilato ciclasa de un organismo eucariote inferior sea capaz de reconocer componente reguladores del sistema adenilato ciclasa de vertebrados.

La semejanza de tamaño y propiedades de la adenilato ciclasa de N. crassa y el componente catalítico C de organismos eucariotes superiores sugiere que debe existir una estrecha relación entre ambos componentes, ésto equivale a considerar que durante la evolución biológica la adenilato ciclasa fué adicionando componentes reguladores, manteniéndose la entidad catalítica sin grandes variaciones.

El sistema adenilato ciclasa sensible a hormonas en organismos eucariotes superiores, constituye lo que podría ser denominado "holociclasa", ya que contiene todos los elementos del sistema y, por ende, todas las propiedades regulatorias inherentes al mismo, es decir, sensibilidad al GTP, la toxina del cólera, fluor

CAPITULO	III	PAGINA	206	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

uro y hormonas.

En bacterias y organismos eucariotes inferiores la adenilato ciclase está aparentemente constituida sólo por una entidad catalítica, insensible a los efectores mencionados. En estos organismos, la enzima puede ser considerada desde este punto de vista - como una "protociclase". En la Tabla XV se detallan las características de las adenilato ciclase estudiadas con cierto detalle en bacterias y organismos eucariotes inferiores (protociclasas). La adenilato ciclase del protozoario Fasciola hepática(310) puede ser considerado según sus características, como una holociclase.

Dentro de las aquí denominadas "protociclasas" pueden existir enzimas con características peculiares según el organismo de que se trate, así, por ejemplo, la adenilato ciclase de Phycomyces es activada por bajas concentraciones de GTP (229).

De la Tabla XV sobresale:

1. En algunos casos las protociclase sólo expresan su actividad en presencia de  $Mn^{+2}$ , como es el caso de la enzima de Neurospora y otros hongos, sin embargo, las holociclasas pueden usar Mg.ATP o Mn.ATP como sustratos.
2. Las "protociclasas" pueden encontrarse en forma soluble o asociada a membrana, por el contrario, las holociclasas se encuentran invariablemente fuertemente asociadas a membrana y sólo pueden ser solubilizadas con detergentes.

Finalmente, es importante señalar que dentro de las "protociclasas", se han descrito efectos hormonales en determinados casos, por ejemplo, el glucagón es capaz de estimular la actividad enzimática en N. crassa "slime" (256), por el contrario, la insulina tiene un efecto inhibitorio (257). En Phycomyces y Tetrahymena pyriformis se han descrito efectos estimuladores de catecolaminas sobre la actividad de adenilato ciclase (229)(311). En ningún caso se ha demostrado que dichos efectos sean mediados por re

CAPITULO. III	PÁGINA 207	RESULTADOS Y DISCUSION
---------------	------------	------------------------

TABLA XV

ORGANISMO	CATION		LOCALIZACION	FACTOR			M
	Mn <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>		F <sup>-</sup>	GTP	TxC	x10 <sup>-3</sup>
<u>PROTOCICLASAS</u>							
Bordetella Pertussis	?	+	S	-	-	-	
Escharichia coli	+	+	M,S	-	-	-	
Brevibacterium Liq.	+	+	S	-	-	-	94
Phycomyces Bl.	?	+	M	-	+	-	
Blastocladie- lla Em.	+	-	M	-	-	-	
Saccharomyces Cerev.	+	-	M,S	-	-	-	
Neurospora crassa	+	-	M,S	-	-	-	202
Mucor rouxii	+	+	M,S	-	-	-	
Tetramyena pyrifer.	?	-	M,S	-	-	-	
Trypanosoma cruzi	+	-	M	-	-	-	117
Células ger- minales de - testículo	+	-	S	-	-	-	69
Linfoma S49 cyc	+	-	M	-	-	-	190
<u>MONOCICLASAS</u>							
Fasciola hepá- tica	+	+	M	+	+	-	115
Higado, tejido adiposo, etc.	+	+	M	+	+	+	180

Características de las adenilato ciclasas de algunas bacterias y organismos eucariotes inferiores (protociclasas) junto con las del sistema adenilato ciclasa en organismos eucariotes superiores (holociclasa). M: asociada a membrana. S: forma soluble (o solubilizada sin detergente). M: peso molecular. TxC: toxina del cólera.

ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA

CAPITULO III	PAGINA 208	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

ceptores específicos o que implique a algún componente regulador.

#### VI. PRESENCIA DE CALMODULINA EN NEUROSPORA CRASSA

Las observaciones preliminares que motivaron el estudio sobre la posible presencia de calmodulina en N. crassa y las implicaciones que este hecho podría tener en cuanto a la regulación de la adenilato ciclasa, fueron las siguientes:

1. Salter et al (163) demostraron en el sistema adenilato ciclasa de cerebro que una vez separados el componente regulador N y el componente catalítico C, la débil actividad enzimática dependiente de  $Mg^{+2}$ , de éste último podía ser estimulada por calmodulina, es pues, factible, considerar que la adenilato ciclasa de Neurospora, cuya relación con el componente catalítico C ha sido demostrada en apartados anteriores, pudiera ser sensible a la calmodulina.
2. Existen en la literatura científica, observaciones que demuestran la presencia de calmodulina en organismos eucariotes inferiores (312,313).
3. Se observó efecto activador sobre la fosfodiesterasa endógena en presencia de  $Ca^{+2}$ , de determinadas fracciones correspondientes a una cromatografía en DEAE-celulosa de un sobrenadante de 105000 xg de N. crassa, StL 74. Como ya se especificó en el apartado IX.2 de la Introducción, el efecto más característico de la calmodulina es la activación de la fosfodiesterasa.

CAPITULO	III	PAGINA	209	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

#### VI,1 PURIFICACION DE LA CALMODULINA DE NEUROSPORA CRASSA

Se realizó según lo especificado en el apartado XVII de "Materiales y Métodos" el método seguido queda reflejado en el esquema de la figura 44.

Como ya se comentó anteriormente, cuando se ensayó el efecto sobre la actividad fosfodiesterasa correspondiente a una preparación de N. crassa parcialmente purificada, de distintas fracciones de una cromatografía en DEAE-celulosa de un sobrenadante de 105000 xg de N. crassa, se observó un pico de activación. Esto llevó a usar dicha cromatografía como primer paso de purificación. La presencia de calmodulina a lo largo del proceso de purificación, se detectó siguiendo la activación de una preparación de fosfodiesterasa de cerebro (apartado XVI "Materiales y Métodos") purificada parcialmente, tal como se especifica en el apartado XV de "Materiales y Métodos".

##### VI,1.1 CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

En la figura 45 se muestra el perfil de elución de la cromatografía en DEAE-celulosa DE52, de un sobrenadante de 105000 xg de N. crassa, StL74. La mayor proporción de proteína eluye a una concentración de NaCl entre 0.15 y 0.35 M, mientras que la calmodulina lo hace a una concentración de NaCl de 0.45 M. La proteína total sembrada en la columna fué de 1800 mg aproximadamente. Las fracciones en las que se detectó la presencia de calmodulina se combinaron y calentaron en baño de agua a 100° C durante 5 minutos, con el fin de inactivar las enzimas endógenas de la preparación. Durante este proceso, precipitó una cierta cantidad de proteína, permaneciendo la calmodulina en la fracción soluble después de centrifugar dicha preparación a 12000 xg durante 15 minutos.

CAPITULO	III	PAGINA	210	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

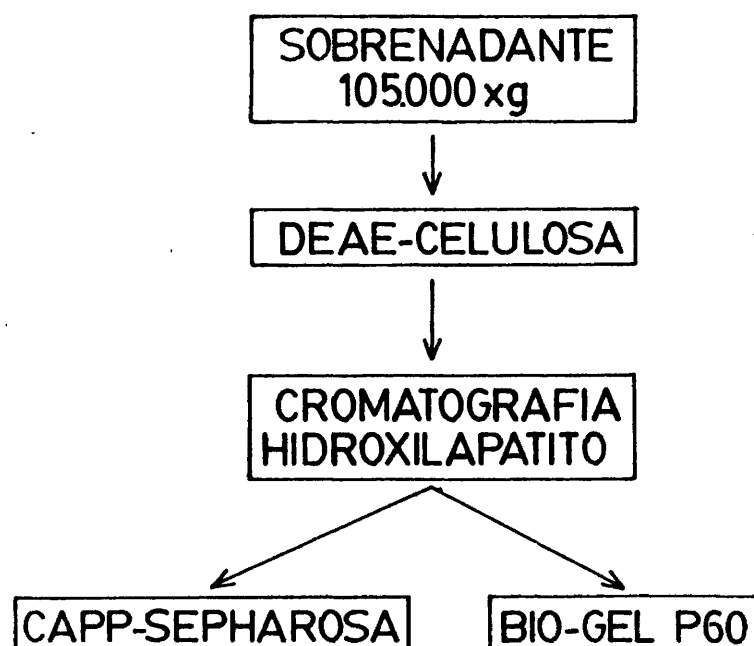


Figura 44. Esquema general de la purificación de la calmodulina de N. crassa.

CAPITULO	III	PAGINA	211	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

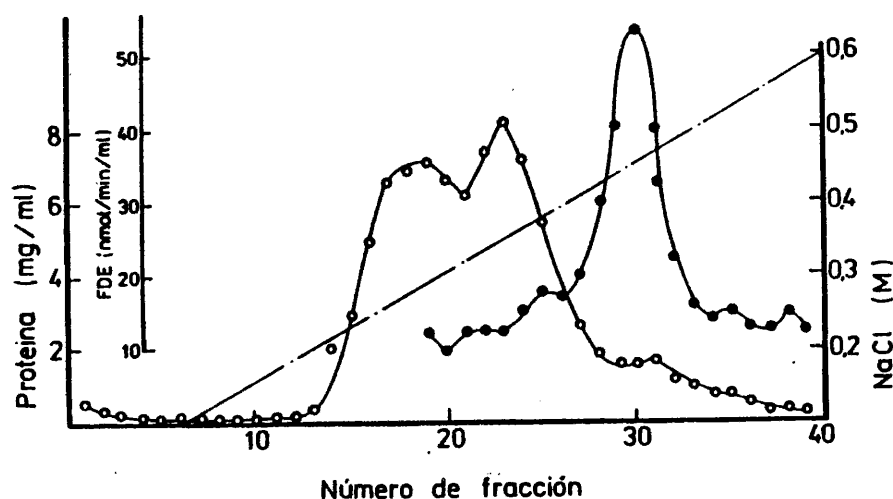


Figura 45. Perfil de elución de una cromatografía en DEAE celulosa DE52, correspondiente a un sobrenadante de 105000 xg de *N. crassa*.

Se aplicaron 165 ml a una columna con un lecho de resina - de 3x30 cm, equilibrada con Tris-HCl 30 mM pH: 7.4. La columna se lavó con 300 ml de tampón de equilibrado, conteniendo NaCl 0.1 M. A continuación se aplicó un gradiente lineal formado por el tampón de lavado y tampón de equilibrado, conteniendo NaCl 0.7 M, el volumen total del gradiente es de 500 ml, el flujo de elución es de 1.5 ml/min y se recogen fracciones de 10 ml.

(●) actividad de fosfodiesterasa de cAMP  
(○) Proteína



CAPITULO	III	PAGINA	212	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

#### VI,1.2 CROMATOGRAFIA EN HIDROXIL APATITO

En la figura 46 se muestra el perfil de elución de la cromatografía en hidroxilapatito de la preparación en DEAE celulosa. La calmodulina eluye a una concentración de fosfato de sodio de 0.1 M, es decir, aproximadamente en la mitad del gradiente aplicado. Las fracciones en las que se detectó la presencia de calmodulina (5-6 mg de proteína) se dializaron extensivamente frente a agua destilada con el fin de eliminar el fosfato.

#### VI,1.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN CAPP-SEPHAROSA

La cromatografía en CAPP-sepharosa, se realizó tal como se especifica en el apartado XVII,3 de "Materiales y Métodos". La asociación de la calmodulina al derivado de la fenotiazina, 2-cloro-10-(3-aminopropil)fenotiazina, se produce en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  (314). La muestra se aplica en estas condiciones y la columna se lava con el mismo tampón hasta que se deja de eluir proteína. Finalmente, la elución de la calmodulina se logra aplicando a la columna el mismo tampón sin  $\text{Ca}^{+2}$  y conteniendo EGTA 10 mM. En la figura 47, se muestra el perfil de elución de la cromatografía en CAPP-sepharosa de la preparación hidroxilapatito de N. crassa.

Este paso de purificación a pesar de ser altamente selectivo y obtenerse buenos rendimientos, tiene el inconveniente que el efecto de activación de la calmodulina sobre la fosfodiesterasa queda sensiblemente disminuido. Esto se debe, en primer lugar, a la presencia de EGTA en el tampón de elución, el cual no siempre puede ser totalmente eliminado y, en segundo lugar, a que en asociación con la calmodulina eluye de la columna cierta cantidad de 2-cloro-10-(3-aminopropil)fenotiazina, la cual inhibe los efectos mediados por la calmodulina.

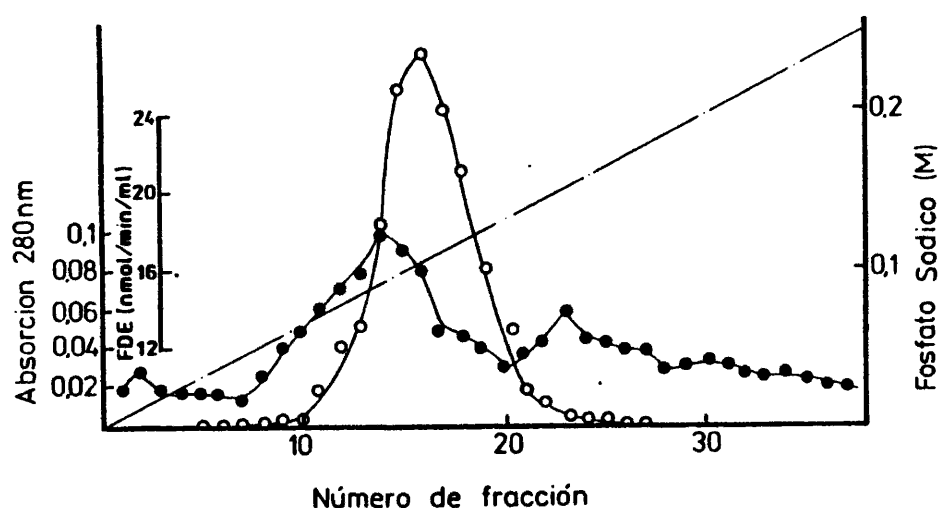


Figura 46. Perfil de elución de una cromatografía en hidroxilapatito, correspondiente a la preparación DEAE-celulosa de *N. crassa*.

Se aplicaron 90 ml a una columna con un lecho de resina de 2.5x20 cm, equilibrada con tampón fosfato sódico 5 mM pH - 7.2. La columna se lavó con 100 ml de tampón de equilibrio y se aplicó un gradiente lineal formado por dicho tampón y tampón fosfato sódico 200 mM pH: 7.4. El volumen total del gradiente es de 200 ml, el flujo de elución es de 0.5 ml/min y se recogieron fracciones de 7 ml.

(O) actividad de fosfodiesterasa de cAMP  
(●) Proteína

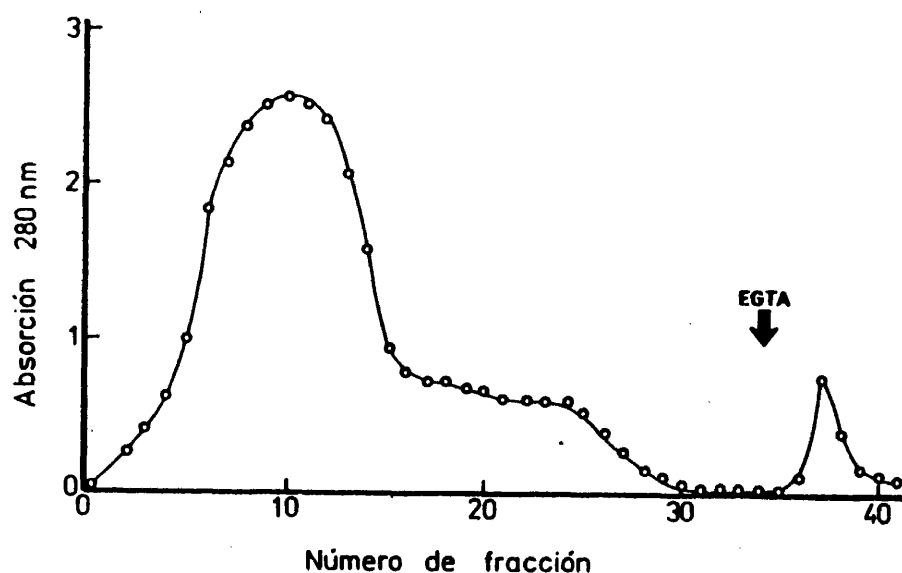


Figura 47. Perfil de elución de una cromatografía en 2-cloro-10-(3-aminopropil)fenotiazina-sepharosa (CAPP-sepharosa) de la preparación hidroxilapatito de *N. crassa*.

El liofilizado correspondiente a la preparación hidroxilapatito se resuspende en 10 ml de tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.4, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM, CaCl 1 mM, NaCl 200 mM y se aplicó a una columna con un lecho de resina de 20x2 cm, equilibrada con el tampón mencionado. Una vez pasada la muestra se lava con el tampón de equilibrado hasta que cesa la elución de proteína, detectada por absorción a 280 nm. En este punto se lava la columna con tampón Tris-HCl 20 mM pH: 7.4 conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM, EGTA 10 mM, NaCl 200 mM. El flujo de elución es de 0.5 ml/min y se recogen fracciones de 2 ml.

CAPITULO	III	PAGINA	215	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

Dada la gran especificidad de la CAPP-sepharosa en retener calmodulina en presencia de  $Ca^{+2}$ , este paso de purificación es un indicativo generalizado de la presencia de calmodulina en un sistema biológico. En el presente caso, las fracciones que eluyeron con el EGTA de la columna de CAPP-sepharosa, al ser sometidas a electroforesis analítica en SDS-poliacrilamida, mostraron la presencia de una única banda correspondiente al peso molecular de la calmodulina (16000 D.)(figura 48). No obstante, los inconvenientes mencionados observados a su vez por otros autores (315), llevaron a usar un paso alternativo de purificación: filtración en Biogel P 60.

#### VI.1.4 FILTRACION EN GEL (BIOGEL P 60)

La preparación de calmodulina purificada por la cromatografía en CAPP-sepharosa, al tener poco efecto activador sobre la fosfodiesterasa, se cromatografió en una columna de Bio-Gel P 60. La calmodulina eluida siguió teniendo su efecto activador disminuido, aparentemente por estar en asociación con el derivado de la fenotiazina, al cual se une durante la cromatografía en la CAPP-sepharosa. Por este motivo, con el objetivo de purificar la calmodulina sin usar un método tan drástico, como la CAPP-sepharosa se realizó la filtración en gel (Bio-Gel P 60) de la preparación de hidroxilapatito.

En la figura 49 se muestra el perfil de elución de dicha cromatografía. Las fracciones en las que se detectó la presencia de calmodulina contenían aproximadamente 0.5 mg de proteína, lo que representa un 0.03 % de la proteína de partida en el extracto original.

En la figura 50 se muestra en gel analítico en SDS-poliacrilamida de la calmodulina de cerebro y de Neurospora, ambas purifica-

CAPITULO	III	PAGINA	216	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

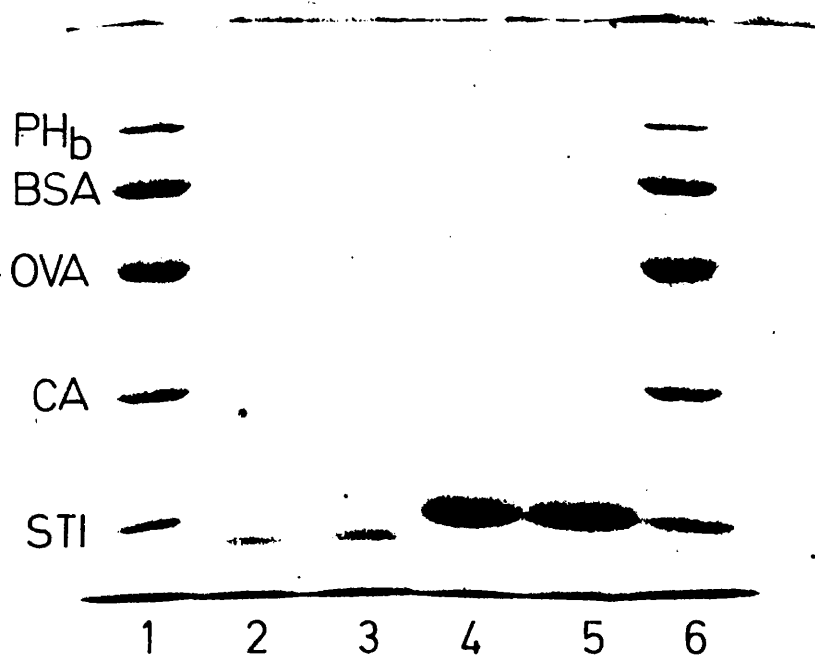


Figura 48. Electroforesis analítica en gel de SDS-polia -  
 crilamida (10 % p/v).  
 4 y 5 Calmodulina de cerebro. 2 y 3 Calmodulina de Neuro-  
spora carassa, ambas purificadas por cromatografía en CAPP  
 sepharosa. 1 y 6 proteínas de peso molecular conocido, sím  
 bolos como en figura 27.

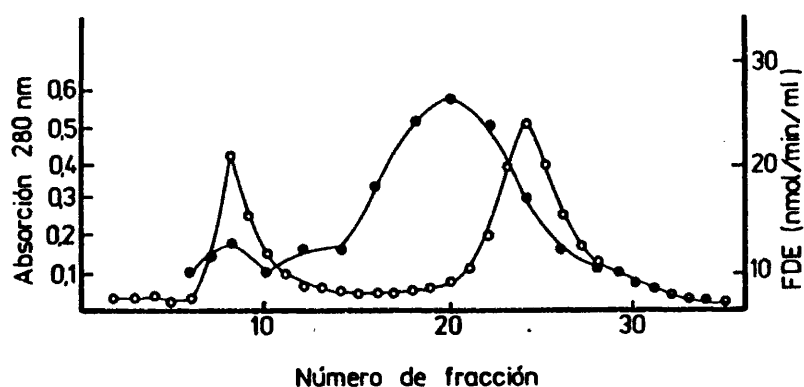


Figura 49. Perfil de elución de una filtración en Bio-Gel P 60 de una preparación de hidroxilapatito de *N. crassa*.

Se aplicaron 0.4 ml de muestra a una columna con un lecho de gel de 1.5 x 60 cm, equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM pH: 7.4. La columna se eluyó con dicho tampón a un flujo de 0.3 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml.

(●) actividad de fosfodiesterasa de cAMP  
(○) Proteína

CAPITULO	III	PAGINA	218	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

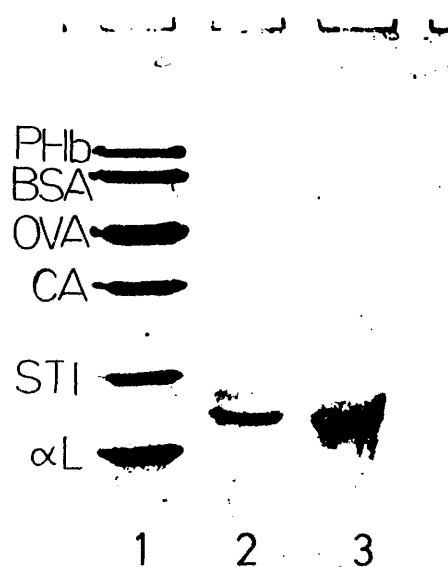


Figura 50. Electroforesis analítica en gel de SDS-poliacrilamida, 15 % (p/v).

1. proteínas de peso molecular conocido. 2. calmodulina de cerebro (60  $\mu$ g de proteína). 3. calmodulina de *N. crassa* (100  $\mu$ g de proteína). Ambas preparaciones de calmodulina fueron purificadas por filtración en Bio-Gel P-60 como paso final del proceso. Símbolos como en figura 27.

CAPITULO	III	PAGINA	219	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

das por el mismo procedimiento, es decir, cromatografía en DEAE-celulosa, hidroxilapatito y Bio-Gel P 60. Se observa la presencia de una banda mayoritaria en cada una de las dos preparaciones. La banda correspondiente a la calmodulina de cerebro tiene un peso molecular de 17000 D. mientras que la correspondiente a Neurospora tiene un peso molecular de 16000 D.

## VI,2 DISCUSION

En este apartado se demuestra la presencia de calmodulina en Neurospora crassa, describiéndose, al mismo tiempo, un método de purificación rápido y simple que permite obtenerla en forma activa y en un estado de alta pureza (figura 50).

La presencia de calmodulina en Neurospora se apoya en las siguientes evidencias:

- La proteína purificada es termoestable y capaz de activar la fosfodiesterasa tanto endógena como de cerebro, en forma dependiente de  $Ca^{+2}$ .
- La proteína queda retenida en una columna de 2-cloro-10-(3-aminopropil) fenotiazina (figuras 47 y 48).
- La proteína purificada tiene una movilidad electroforética en SDS-poliacrilamida, similar a la calmodulina de cerebro (figuras 48 y 50).

La calmodulina es una proteína ampliamente distribuida, tanto en el reino animal como el vegetal (316). Su presencia en organismo eucariotes inferiores se ha puesto de manifiesto en los últimos años, siendo estudiada en: Elastocladiella emersonii (312), Candida albicans y Saccharomyces cerevisiae (313), Dictyostelium discoideum (317), Tetrahymena (318), Physarum (319) y Chlamidomys



CAPITULO	III	PAGINA	220	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

nas (320). Los estudios más detallados realizados en Tetrahyme na y D. discoideum, han revelado la existencia de pequeñas diferencias entre la calmodulina de estos organismos y la de cerebro.

En las figuras 48 y 50, se observa que, la calmodulina de Neuros pura tiene un poco más de movilidad electroforética que la de ce rebro. Este hecho ha sido también descrito con la calmodulina - de D. dicoideum y puede revelar pequeñas diferencias entre la - calmodulina de organismos eucariotes inferiores con respecto a - la de tejidos animales.

El método seguido para la purificación de la calmodulina de Neu- rospora está basado en el empleado por Clarke et al (321) para - la purificación de calmodulina de D. dicoideum. Algunos autores han utilizado la cromatografía de afinidad en CAPP-sepharosa, por su gran especificidad para la purificación de calmodulina (314). La experiencia realizada en este sentido sugiere que la calmodu- lina se obtiene por este método en un alto grado de pureza, pero sensiblemente inactivada, aparentemente por su unión irreversi- ble con el derivado de la fenotiazina con que el que eluye de la columna de afinidad.

Por el método descrito se obtuvieron 0.5 mg de calmodulina a par- tir de 22 g de micelio seco, o en otros términos, 0.5 mg de cal- modulina a partir de un sobrenadante de 105000 xg de Neurospora conteniendo 1800 mg de proteína. Así pues, la calmodulina puri- ficada representa el 0.03 % de la proteína contenida en el ex - tracto de partida. Estos valores son del mismo orden que los - descritos para la purificación de la calmodulina de D. discoide- um (321).

CAPITULO	III	PAGINA	221	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

# VII. ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA DE NEUROSPORA POR CALMODULINA

El primer efecto observado de la calmodulina de Neurospora fué - la activación de la fosfodiesterasa, tanto propia como de cerebro. Este hecho fué aprovechado para seguir la posición de la calmodulina a lo largo del proceso de purificación.

Debido a los antecedentes existentes en la literatura científica sobre la modulación de la adenilato ciclasa por calmodulina (apartado IX,2 Introducción) se ensayó el efecto de la calmodulina purificada de Neurospora sobre la actividad de adenilato ciclasa, medida en presencia de  $Mg^{+2}$ , de una preparación de hexilamino-sepharosa de Neurospora (apartado VII,1 "Materiales y Métodos"). El resultado obtenido se muestra en la figura 51.

La calmodulina estimula, aproximadamente 9 veces la débil actividad de adenilato ciclasa dependiente de  $Mg^{+2}$  de Neurospora.

El ensayo de calmodulina contiene  $Ca^{+2}$  50  $\mu M$ , al incrementarse - la concentración de  $Ca^{+2}$  hasta 200  $\mu M$  el nivel de activación alcanzado no se modifica, lo que sugiere que el sistema se satura a baja concentración del catión. Al añadir EGTA 100  $\mu M$  al medio de incubación la activación desaparece, siendo el efecto revertido por  $Ca^{+2}$  (figura 51). Este hecho demuestra que el efecto de la calmodulina está mediado por dicho catión.

Por otra parte, se observó que la actividad de adenilato ciclasa en presencia de  $Mn^{+2}$  es fuertemente inhibida (80 %) por calmodulina, sin embargo, en este caso, el efecto no es mediado por  $Ca^{+2}$  y se puede explicar por la desaparición de  $Mn^{+2}$  libre al asociarse a la calmodulina.

En la figura 52 se muestra la variación de la actividad de fosfodiesterasa de cerebro al ir incrementando la concentración de la calmodulina purificada de cerebro en el medio. Se observó una curva dosis-respuesta, produciéndose la mitad de la activación máxima con 60 ng de calmodulina.

CAPITULO	III	PAGINA	222	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

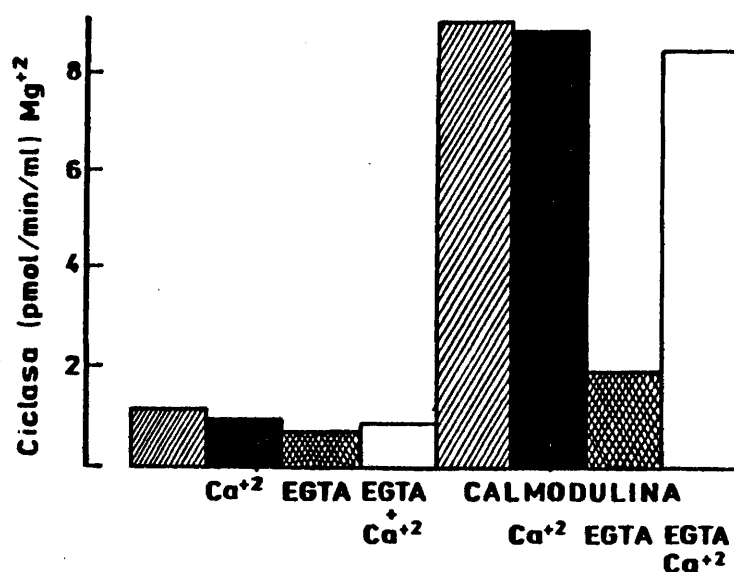


Figura 51. Actividad de adenilato ciclase medida en presencia de  $Mg^{2+}$  de una preparación hexilamino-sepharosa de *Neurospora*, sin y con calmodulina purificada de *Neurospora*. Los ensayos contienen  $CaCl_2$  50  $\mu M$ , mas las adiciones que se especifican en la figura. El tiempo de incubación es de 15 minutos.

CAPITULO III	PAGINA 223	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

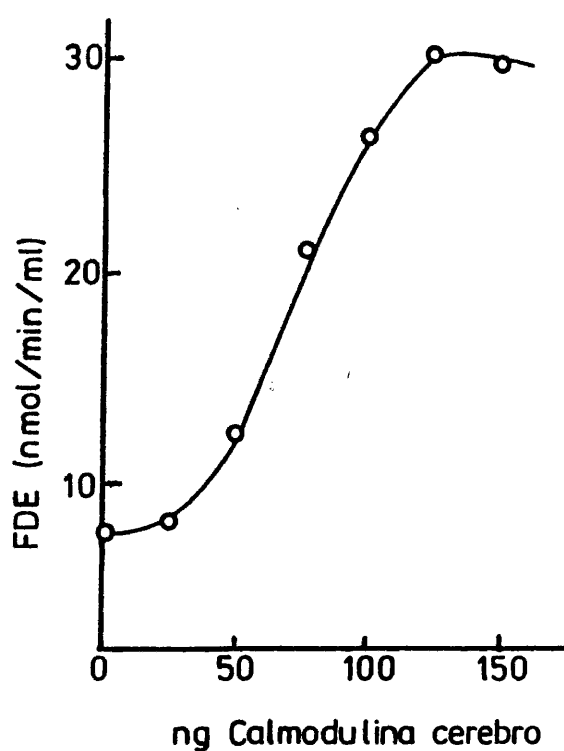


Figura 52. Actividad de fosfodiesterasa de cAMP de cerebro, preparada tal como se especifica en el apartado XV de "Materiales y Métodos", en función de la concentración de calmodulina purificada de cerebro en el medio de incubación.

CAPITULO	III	PAGINA	224	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

En la figura 53 se muestra la variación de la actividad de adenilato ciclasa de Neurospora, medida en presencia de  $Mg^{+2}$  al ir incrementando la concentración de calmodulina en el medio. Puede observarse que la afinidad de la adenilato ciclasa por la calmodulina propia es mayor que por la de cerebro. En el primer caso la mitad de la actividad máxima se produce con 30 ng de calmodulina, mientras que en el segundo caso, se produce con 60 ng, aproximadamente. Por otra parte, la activación alcanzada con la calmodulina de Neurospora es el doble de la obtenida con calmodulina de cerebro.

Este resultado confirma la observación antes mencionada, esto es la calmodulina posibilita a la adenilato ciclasa de Neurospora para poder expresar su actividad en presencia de  $Mg^{+2}$ . Las curvas dosis-respuesta observadas, confirman, además, la especificidad de tal efecto.

La diferencia de afinidad y grado de activación alcanzado por la adenilato ciclasa en presencia de la calmodulina de Neurospora o de cerebro, puede ser debida a una diferencia entre estas dos proteínas, localizada en un dominio molecular directamente implicado con el efecto observado, o bien a la existencia de un cofactor específico en la preparación de calmodulina de Neurospora que estaría ausente en la de cerebro.

## VII,1 DISCUSION

En este apartado se demuestra el efecto estimulador de la calmodulina sobre la actividad de la adenilato ciclasa, ensayada en presencia de  $Mg^{+2}$  de Neurospora. El efecto es dependiente de  $Ca^{+2}$  saturándose a bajas concentraciones del catión (50  $\mu M$ ).

De este hecho se derivan las siguientes consideraciones:

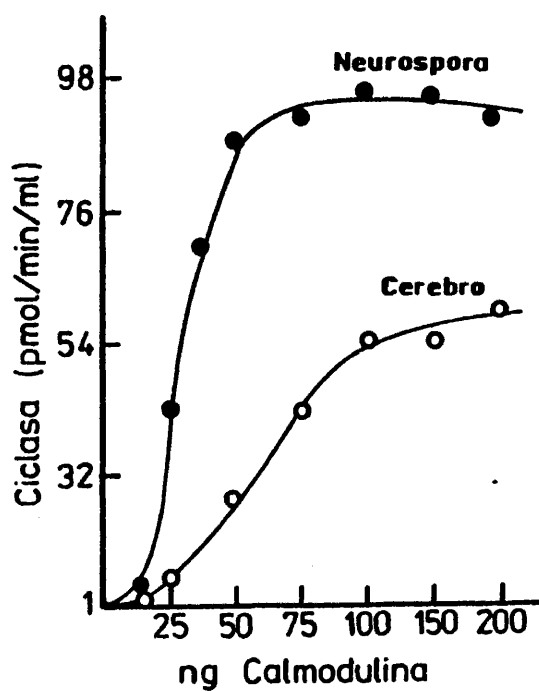


Figura 53. Actividad de adenilato ciclasa, medida en presencia de  $Mg^{2+}$ , de una preparación hexil-amino-sepharosa, en función de la concentración de calmodulina de *Neurospora* o de cerebro en el medio. Las mezclas de ensayo contienen  $CaCl_2$   $50 \mu M$ , el tiempo de incubación es de 15 minutos.

CAPITULO III	PAGINA 226	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

1. La calmodulina puede ser un regulador fisiológico de la adenilato ciclasa de Neurospora, así como puede serlo, también, de la fosfodiesterasa.
2. Nuevamente se da coincidencia en cuanto a las propiedades - del componente catalítico C de la enzima de organismos de eu - caríotes superiores y la adenilato ciclasa de Neurospora, ya que en ambos casos la actividad enzimática es fuertemente de - pendiente de  $Mn^{+2}$  y la calmodulina confiere a la enzima la - capacidad de usar el Mg.ATP como sustrato (153)(figura 54). En ambos casos, el efecto alcanza su máximo nivel a baja con - centración de  $Ca^{+2}$  (50  $\mu M$ ).
3. Como se describe en el apartado V,5 de esta sección de "Re - sultados y Discusión" (tabla XV) dentro de las denominadas - "protociclasas" existen aquellas que pueden expresar su acti - vidad, tanto en presencia de  $Mg^{+2}$  como de  $Mn^{+2}$ , como por - ejemplo en la mayoría de las bacterias (211), o aquellas que son fuertemente dependientes de  $Mn^{+2}$  para expresar su activi - dad, como la enzima de Neurospora y otros hongos. El hecho de que la calmodulina predisponga a la enzima de Neurospora a usar Mg.ATP como sustrato, sugiere que otras "protocicla - sas" puedan estar sujetas a este tipo de modulación u otra - similar, de aquí que se observen estas diferencias en cuanto al catión requerido para la expresión de la actividad catalí - tica en las "protociclasas". A este respecto, cabe destacar que la adenilato ciclasa de Bordetella pertussis es también sensible a la calmodulina, a pesar de que en organismos proca - ríotes no se ha detectado la presencia de este efector (322) Puede de hecho, pensarse que la calmodulina u otros efectores puedan constituir un sistema de regulación primario de las - denominadas "propociclasas", este sistema de regulación ha - bría evolucionado hasta constituir las "holociclasas" o sis - temas adenilato ciclasas sensibles a hormonas de células ani - males.

CAPITULO	III	PAGINA	227	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

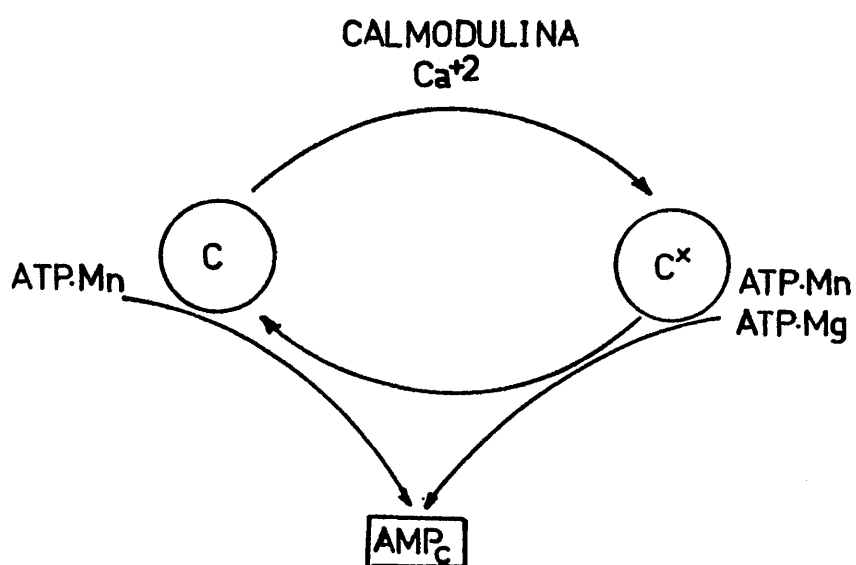


Figura 54. Modelo propuesto para la modulación de la actividad de adenilato ciclasa de *N. crassa* por calmodulina .



CAPITULO III	PAGINA 228	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

4. El nivel de concentración de cationes divalentes en Neurospora u otros hongos, no ha sido estudiado en detalle, se puede considerar, no obstante, que la concentración de los mismos debe ser de un orden similar al encontrado en células animales, es decir, se encontrarían de mayor a menor concentración:  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ . La adenilato ciclasa de Neurospora y otros organismos eucariotes inferiores puede usar  $Mg.ATP$  y  $Mn.ATP$ , como sustratos y la actividad de la enzima "in vivo" dependería de la relación  $Mg^{+2}/Mn^{+2}$ . En el caso de la enzima de Neurospora, la actividad enzimática vendría modulada, además por la concentración de  $Ca^{+2}$  y calmodulina.
5. Un aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{+2}$  en Neurospora, originaría la activación, tanto de la fosfodiesterasa de cAMP como de la adenilato ciclasa, ambos efectos, mediados por calmodulina. Parece lógico pensar que deba existir una compartimentalización entre ambas enzimas, pues en caso contrario, la activación de la adenilato ciclasa quedaría contrarrestada por la de la fosfodiesterasa, y la variación de los niveles de cAMP sería demasiado rápida como para pensar que éste pudiera producir alguna acción fisiológica. Otra posibilidad es, suponer la existencia de reguladores, aún no descritos, que permitieran equiparar las actividades de estas enzimas "in vivo" y contemplar la posibilidad de una activación secuencial de ambas enzimas.

#### VIII. ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA ADENILATO CICLASA DE NEUROSPORA CRASSA

Las técnicas clásicas de obtención de anticuerpos a partir del suero de animales inmunizados, tiene cuatro dificultades princi-

CAPITULO III	PAGINA 229	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

pales:

1. Los títulos son generalmente bajos.
2. Los anticuerpos producidos son heterogéneos, aunque el animal haya sido inmunizado con un antígeno en alto grado de pureza.
3. La fuente de obtención de anticuerpos es limitada.
4. Una misma combinación de anticuerpos es imposible de reproducir en un nuevo animal (323).

En el año 1975 César Milstein (324) puso a punto una técnica que permite fusionar células de bazo de un animal inmunizado con una línea de mieloma defectiva en la enzima hipoxantina-guanosinribosil-transferasa (HPGRT). El resultado es un mieloma híbrido o hibridoma, que es capaz de producir anticuerpos y de crecer en un medio de cultivo por tiempo indefinido. Después de la fusión al suplementar las células con un medio conteniendo hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT) las células del mieloma no pueden crecer por ser deficientes en HPGRT y estar la síntesis "de novo" de nucleótidos bloqueada por la presencia de aminopterina, de esta forma se van seleccionando los hibridomas. Posteriormente, por dilución limitante se van seleccionando diferentes clones, esto es, líneas celulares a partir de un sólo hibridoma y, por tanto, secretoras de un solo tipo de anticuerpos que reconocerá un determinante antigénico específico, lo que se conoce con el nombre de anticuerpo monoclonal.

Una vez seleccionado el clon, o los clones que reconocen el antígeno bajo estudio, se lo cultiva en gran cantidad, pudiéndose generar tumores en animales, los cuales serán, a su vez, fuente de grandes cantidades del anticuerpo (figura 21).

El empleo de la técnica de los hibridomas, permite superar las dificultades existentes, comentadas al principio de este apartado, de las técnicas clásicas de obtención de anticuerpos, ya que:

CAPITULO III	PAGINA 230	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

1. La obtención del anticuerpo no requiere que el animal sea inmunizado con el antígeno en estado de alta pureza.
2. El anticuerpo monoclonal reconoce un determinante antigénico específico.
3. El anticuerpo monoclonal puede ser obtenido en grandes cantidades.
4. La línea del hibridoma productor del anticuerpo puede ser - mantenida indefinidamente, asegurándose, así, la fuente de - obtención del anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales tienen una gran aplicación dentro - de la investigación clínica, por ejemplo, en el diagnóstico de - ciertas enfermedades o en la caracterización de antígenos especí - ficos de membrana. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales, han permitido encarar problemas de la investigación bioquí - mica desde una nueva perspectiva, dada su gran especificidad. Así por ejemplo, se han podido realizar cromatografías de inmunoafi - nidad con el anticuerpo acoplado a un soporte de agarosa que per - mite purificar fácilmente una determinada proteína reconocida - por el anticuerpo. El caso más difundido ha sido la purifica - ción de interferón.

La obtención de anticuerpos monoclonales para la adenilato cicla - sa de Neurospora crassa se realizó de acuerdo a lo especificado en el apartado XIX de "Materiales y Métodos". La fusión se rea - lizó con una línea de mieloma no secretante (63-Ag-8.6.5.3) de - fectiva en la enzima HPGRT.

Aproximadamente, después de un mes de realizada la fusión, se en - sayaron los medios de los diferentes cultivos de hibridomas, pa - ra seleccionar aquellos que fueran secretores de anticuerpos, lo que se realizó de acuerdo a lo especificado en el apartado XIX,3 de "Materiales y Métodos". Los medios seleccionados se destina - ron para el clonaje por dilución en multiplacas de cultivo de 2 ml (figura 21).

CAPITULO III	PAGINA 231	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

De esta forma se cultivaron 200 placas durante aproximadamente - un mes. La última semana se fué juntando medio condicionado de los diferentes cultivos para realizar los ensayos de inhibición de la actividad de adenilato ciclasa de N. crassa, tal como especifica el apartado XIX,4 de "Materiales y Métodos". En la Tabla XVI (experimento 1) se muestran algunos resultados de dicha experiencia. El medio control, procedente de un cultivo de híbridos originados por fusión de células de bazo de animales no inmunizados, originó una inhibición del 12-14 % de la actividad de adenilato ciclasa, la mayoría de los medios ensayados produjeron inhibiciones del orden del 7-22 % de la actividad enzimática, sin embargo, los medios procedentes de los denominados clones 2, 12, 30, 90 y 91 inhibieron la actividad de adenilato ciclasa entre el 49-58 %.

El medio procedente del clon 90, que originó la máxima inhibición (58 %) fué elegido para un posterior reclonaje por dilución y para realizar los experimentos que se describen a continuación

El efecto inhibitorio del clon 90, aumentó con la cantidad de dicho medio presente en el ensayo, llegándose a alcanzar una inhibición de hasta un 80 % de la actividad enzimática (figura 54).

En la figura 55 se muestra la variación del grado de inhibición del clon 90, al ir aumentando el tiempo de preincubación del medio con la preparación enzimática antes del ensayo de la actividad de la adenilato ciclasa en la mezcla. La inhibición alcanza su máximo nivel a los 180 minutos de preincubación.

Cuando el medio del clon 90 se trata con suero de conejo anti-ratón, el efecto inhibitorio de dicho medio desaparece (Tabla XVI, experimento 2).

Este hecho, junto con el anteriormente descrito sobre la dependencia del tiempo de preincubación con el grado de inhibición alcanzado por el clon 90 sobre la actividad enzimática de la adenilato ciclasa, sugieren que el efecto inhibitorio, surge de una reacción antígeno-anticuerpo y no a un efecto inespecífico del

CAPITULO	III	PAGINA	232	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

EXPERIMEN.	MEDIO	VOLUMEN ( $\mu$ l)	TIEMPO PRE INCUBACION (min)	ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA (pmol/min/mg prot.)	DE INHIBI CION (%)
1					
	Clon 2	20	180	306	49
	Clon 12	20	180	252	58
	Clon 30	20	180	270	55
	Clon 90	20	180	252	58
	Clon 91	20	180	270	55
	Clon 6	20	180	558	7
	Clon 22	20	180	468	22
	Clon 82	20	180	498	17
	control	20	180	516	14
	nada	--	180	601	--
2					
	control	20	180	337	--
	Clon 90				
	(tratado				
	con sue				
	ro de -	equi			
	conejo -	vale.			
	anti-ratón)	20	180	350	--
	Clon 90				
	(tratado				
	sin suero	equi			
	de conejo	vale.			
	anti-ratón)	20	180	117	65

TABLA XVI

Experimento 1. Inhibición producida por diferentes medios de hibridomas sobre la actividad de adenilato ciclasa de Neurospora. Las condiciones del ensayo son las indicadas en el texto.

Experimento 2. Resultado sobre la inhibición de la actividad de adenilato ciclasa de Neurospora después de tratar el medio del clon 90 con suero de ratón, conteniendo o no, suero de conejo anti-ratón. 100  $\mu$ l del medio del clon 90 fueron tratados con 50  $\mu$ l de suero de ratón en TBS-BSA (5:1 v/v) más de 100  $\mu$ l de TBS-BSA conteniendo o no, 14  $\mu$ g/ml de suero de conejo anti-ratón IgC (Capel). Las mezclas se mantuvieron a 0° C durante 18 horas y se centrifugaron a baja velocidad. Alicuotas de los sobrenadantes (50  $\mu$ l) equivalentes a 20  $\mu$ l del medio original fueron usadas como fuente de actividad de adenilato ciclasa. Los resultados expresados son representativos de al menos tres experimentos distintos.

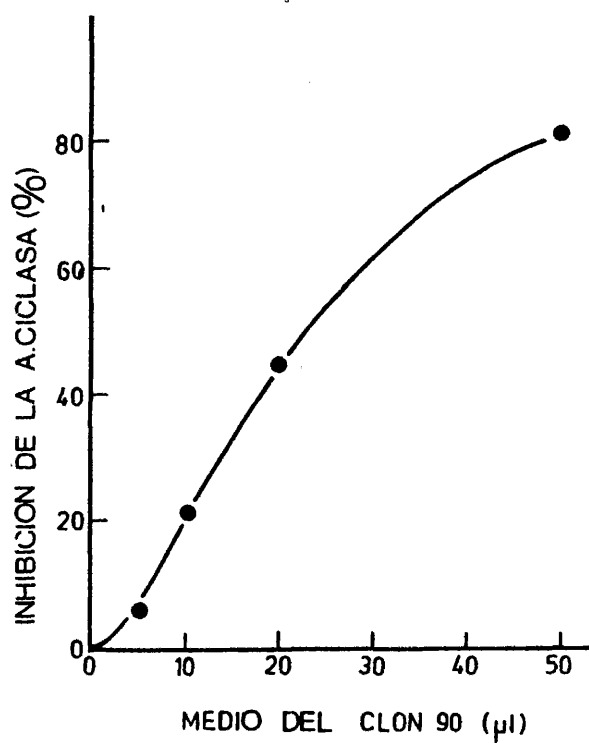


Figura 55. Variación de la inhibición sobre la actividad de adenilato ciclasa de *N. crassa*, al ir aumentando la cantidad de medio condicionado del clon 90 presente en el ensayo.

20  $\mu$ l de la preparación enzimática se preincubaban con las cantidades especificadas de anticuerpo durante 180 minutos a 22° C. Seguidamente, en la mezcla se determina la actividad de adenilato ciclasa, tal como especifica el apartado V de "Materiales y Métodos".

CAPITULO	III	PAGINA	234	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

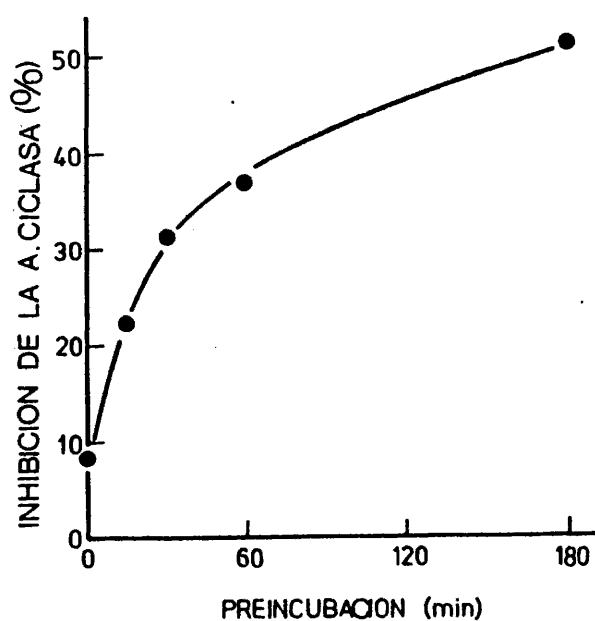


Figura 56. Inhibición de la actividad de adenilato ciclasa de *N. crassa* por el medio condicionado del clon 90, en función del tiempo de preincubación de la mezcla. 20  $\mu$ l de la preparación enzimática se preincubaban con 20  $\mu$ l de medio durante los tiempos que se especifican a 22° C. Se guidadamente en la mezcla se determina la actividad de adenilato ciclasa, tal como se especifica en el apartado V de "Materiales y Métodos".

CAPITULO III	PAGINA 235	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

medió.

Finalmente se probó el efecto del anticuerpo del clon 90 sobre la actividad de adenilato ciclasa dependiente de  $Mn^{+2}$  de una variedad de fuentes biológicas: Neurospora, tanto en su forma soluble como asociada a membrana: Mucor rouxii y Trypanosoma cruzii, en su forma asociada a membrana, testículo de rata en su forma soluble y eritrocito de pavo en su forma asociada a membrana. El resultado se muestra en la Tabla XVII, se observó una inhibición variable sobre la actividad de la adenilato ciclasa de los organismos eucariotes inferiores probados, pero el medio no tuvo efecto sobre la actividad enzimática de testículo o eritrocito.

#### VIII,1 DISCUSION

En el presente apartado se muestran evidencias sobre la obtención de anticuerpos monoclonales para la adenilato ciclasa de Neurospora, siendo de esta forma, la primera vez que se producen anticuerpos para una adenilato ciclasa. Dentro de las enzimas implicadas en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, se ha descrito la obtención de anticuerpos monoclonales para la guanilato ciclasa - (325) y la fosfodiesterasa (326). En ninguno de los dos casos el anticuerpo parece reconocer el sitio activo. En el presente estudio los anticuerpos monoclonales producidos para la adenilato ciclasa reconocen el sitio activo, ya que fueron seleccionados por la inhibición producida sobre la actividad enzimática.

El clon 90 obtenido deberá ser reclonado para asegurar mayor especificidad en el anticuerpo producido. El clon elegido finalmente se cultivará en gran escala para producir suficiente cantidad del anticuerpo (figura 21).

El anticuerpo monoclonal producido tiene importantes aplicaciones en el estudio de la adenilato ciclasa, ya que entre otras cosas:



CAPITULO III	PAGINA 236	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

FUENTE BIOLOGICA	PREPARACION	ACTIV. ADENILATO CICLASA (pmol/min/mg de prot)		INHIBI CION (%)
		MEDIO CONTROL	MEDIO Clon 90	
Eritrocito de pavo	Membranas	29.0	29.3	--
Testículo de rata(soluble)	Extracto crudo	7.2	8.3	--
	DEAE-celulosa	32.0	33.0	--
	Bio-Gel	235.0	236.0	--
Trypanosoma - cruzi	Membranas			
	(sedimento de 40000 x g)	815.0	423.0	52
Mucro rouxii	Extracto crudo	47.1	37.0	22
Neurospora crassa(soluble)	Bio-Gel	536.0	97.0	82
Neurospora crassa(membranas)	Membranas(sedimento de 40000 xg)	36.0	25.0	30

TABLA XVII

Efecto del medio condicionado del clon 90 sobre la actividad de adenilato ciclase de una variedad de fuentes y reparaciones.

20  $\mu$ l de cada preparación enzimática se preincubaban con 20  $\mu$ l de medio durante 180 minutos a 22° C. Seguidamente se determina en la mezcla la actividad de adenilato ciclase, tal como se especifica en el apartado V de "Materiales y Métodos".

CAPITULO III	PAGINA 237	RESULTADOS Y DISCUSION
--------------	------------	------------------------

1. Permite la purificación de la enzima por inmunoadfinidad.
2. Permite la caracterización de determinados dominios moleculares reconocidos por el anticuerpo.
3. Con el anticuerpo "marcado" se pueden hacer estudio de localización de la enzima "in vivo".
4. Se pueden precipitar polisomas donde la enzima se esté sintetizando y, de esta manera, aislar RNA específico, lo que posibilita realizar estudios de ingeniería genética.

El anticuerpo producido por el clon 90 parece reconocer en mayor o menor grado, el sitio activo de la adenilato ciclasa de organismos eucariotes inferiores, pero no el de la enzima de testículo o eritrocito, aunque en estos últimos casos el anticuerpo puede de por sí reconocer otros dominios de la molécula, que al no originar inhibición de la actividad enzimática pasarían desapercibidos.

Estas observaciones sugieren que el determinante antigénico reconocido por el anticuerpo en la enzima de Neurospora pueda existir con un cierto grado de semejanza, ya sea de secuencia de aminoácidos o de conformación estructural en la enzima de otros organismos eucariotes inferiores, lo que da más validez al término "protociclasas", empleado en esta Tesis para referirse a las adenilato ciclasas insensibles a determinados efectores, tales como flúoruro, toxina del cólera o nucleótidos de guanosina.

Del hecho que el anticuerpo no inhiba la enzima de testículo o de eritrocito, no se puede concluir que las enzimas deban ser diferentes, ya que el dominio molecular reconocido por el anticuerpo monoclonal es muy específico. Por otra parte, en estas enzimas el dominio molecular reconocido puede no afectar la actividad catalítica, e incluso puede llegarse a suponer que la región reconocida en la enzima de Neurospora corresponda en la enzima de testículo o eritrocito a un dominio molecular interno de la molécula inaccesible al anticuerpo.

CAPITULO	III	PAGINA	238	RESULTADOS Y DISCUSION
----------	-----	--------	-----	------------------------

Dada la gran especificidad del anticuerpo monoclonal en reconocer - un determinado "locus" de la molécula, esta técnica tiene derivaciones preferentemente desde un punto de vista operativo, no siendo recomendado, por ejemplo, para relacionar o buscar similitudes estructurales entre determinadas proteínas, ya que moléculas con una determinada semejanza estructural, pueden no ser reconocidas, de igual forma, por un anticuerpo monoclonal específico para dicha molécula. Así, por ejemplo, anticuerpos monoclonales para la guanilato ciclasa de pulmón de rata, no reconocen la enzima equivalente de conejo (325).

CAPITULO IV	PAGINA 239	CONCLUSIONES
-------------	------------	--------------

CONCLUSIONES

CAPITULO	IV	PAGINA	240	CONCLUSIONES
----------	----	--------	-----	--------------

#### IV. CONCLUSIONES

1. La adenilato ciclasa de Neurospora crassa es una enzima débilmente asociada a membrana, la cual puede obtenerse en forma soluble, sin el uso de detergentes, empleando una solución de alta fuerza iónica en el medio de extracción del micelio.
2. Se purificó a homogeneidad la actividad de adenilato ciclasa soluble de Neurospora crassa, a partir de un sobrenadante de 105000 x g, empleando los siguientes pasos: cromatografía en hexilamino-sepharosa, filtración en Bio-Gel A 5 m, cromatografía en azul-sepharosa y recromatografía en azul-sepharosa.
3. La enzima purificada presenta una única banda de SDS-poliacrilamida, teñido con  $\text{Ag NO}_3$ , correspondiente a un peso molecular de 66000 D.
4. En condiciones renaturalizantes se detectó actividad de adenilato ciclasa en una zona de los geles de SDS-poliacrilamida, correspondiente a dicho peso molecular.
5. La purificación lograda fué de 850 veces, con un rendimiento del 3 %.
6. La enzima presenta un punto isoeléctrico de 4.6 unidades. Se calcularon los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la enzima por medio de filtraciones en gel y ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa, hechos en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{D}_2\text{O}$ . Los resultados indicaron que la enzima tiene un coeficiente de sedimentación de 6.2 S, un radio de Stokes de 7.3 nm, un volumen específico parcial de 0.74 ml/g y un peso molecular relativo de 200000 D. Este último dato, junto con el resultado del peso molecular calculado en gel de SDS-poliacrilamida de la enzima purificada, sugieren para la misma, una estructura oligomérica, constituida por tres subunidades de 66000 D. de peso

CAPITULO	IV	PAGINA	241	CONCLUSIONES
----------	----	--------	-----	--------------

molecular.

7. El comportamiento cinético de la actividad enzimática frente a la concentración el sustrato, Mn.ATP es sigmoideo presentando un  $S_{0.5}$  de 1.2 mM y un coeficiente de Hill de 2.5. La actividad enzimática es estimulada por  $Mn^{+2}$  a baja concentración de sustrato e inhibida por ATP. Estos resultados fueron semejantes cuando se realizaron los estudios cinéticos con condiciones de Neurospora permeabilizadas.
8. La adenilato ciclasa de Neurospora es capaz de interactuar con componentes reguladores del sistema adenilato ciclasa de eritrocito de pavo, conformando un sistema con las mismas propiedades que el de organismos eucariotes superiores. Este resultado y las semejanzas de tamaño y propiedades enumeradas en esta Tesis, sugieren que deba existir una estrecha relación entre la adenilato ciclasa de Neurospora y el componente catalítico C del sistema adenilato ciclasa de organismos eucariotes superiores.
9. Se demostró la existencia de calmodulina en Neurospora crassa.
10. Se purificó a homogeneidad la calmodulina de Neurospora crassa a partir de un sobrenadante de 105000 x g, empleando los siguientes pasos: cromatografía en DEAE-celulosa, hidroxilapatito, y Bio-Gel P 60.
11. La calmodulina purificada mostró una banda en gel de SDS-poliacrilamida, correspondiente a un peso molecular de 16000 D.
12. La calmodulina confiere a la adenilato ciclasa de Neurospora, la capacidad de usar Mg.ATP como sustrato, siendo dicho efecto, mediado por  $Ca^{+2}$ .
13. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales para la adenilato ci -

CAPITULO	IV	PAGINA	242	CONCLUSIONES
----------	----	--------	-----	--------------

clasa de Neurospora, capaces de inhibir específicamente la actividad enzimática.

14. Los anticuerpos monoclonales obtenidos, inhiben con un grado variable, la actividad de adenilato ciclase de los organismos eucariotes inferiores probados, sin embargo, no afectan la actividad de la enzima de testículo o de eritrocito.

CAPITULO	V	PAGINA	243	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

BIBLIOGRAFIA



CAPITULO	V	PAGINA	244	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

V. BIBLIOGRAFIA

1. Fox, S.W. (1976) Origins of Life, 7 (1): 49.
2. Alvarado, F. (1970) Bol. Real. Soc. Esp. Hist. Nat. 68: 33.
3. Baulieu, E.E. (1978) Hormones, Hermann Ed. Paris.
4. Huxley, J.S. (1935) Biol. Rev. 10: 427.
5. Rall, T.W.; Sutherland, E.W.; Berthet, J. (1957) Biol. Chem. 224: 463.
6. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. (1960) Pharmac. Rev. 12: 265.
7. Sutherland, E.W.; Rall, T.W.; Menon, T. (1962) J. Biol. Chem. 237: 1220.
8. Butcher, R.W.; Sutherland, E.W. (1962) J. Biol. Chem. 237: 1244.
9. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. (1960) Pharmac. Rev. 12: 265.
10. Robinson, G.A.; Butcher, R.W.; Sutherland, E.W. (1971) Cyclic AMP., Academic Press, New York.
11. Berridge, M.J. (1975) Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 6: 1.
12. de Jonge, H.R. (1981) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14: 315.
13. Flawiá, M.M.; Torres, H.N. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6873.
14. Kornblihtt, A.R. (1980) TESIS DOCTORAL. Universidad Buenos Aires.

CAPITULO	V	PAGINA	245	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

15. Torres, H.N. (1980) Endocrinología Molecular, Ed. El Ateneo Cap. 7, pp. 75. Buenos Aires.
16. Greengard, O. (1969) Science 163: 891.
17. Weiss, B. (1970) Biogenic Amines as Physiological Regulators, J.J. Blum Ed., Prentice Hall, New Jersey.
18. Chlapowski, F.J.; Butcher, R.W. (1973) Biochim. Biophys. Acta 309: 138.
19. Varimo, K.; Londesborough, J. (1976) Biochem. J. 159: 363.
20. Ide, M. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 144: 262.
21. Brown, E.G.; Al-Nafari, T.; Newton, R.P. (1979) Phytochemistry 18: 9.
22. Davoren, P.R.; Sutherland, E.W. (1963) J. Biol. Chem. 238: 3016.
23. Pohl, S.L.; Birnbaumer, L.; Rodbell, M. (1969) Science 164: 566.
24. Neville, D.M.Jr. (1968) Biochim. Biophys. Acta 154: 540.
25. Hetcher, O.; Bar, H.P.; Matsuka, M.; Soifer, D. (1969) Life Sciences 8. Part. 1: 935.
26. Soifer, D.; Hetcher, O. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230: 539.
27. Perkins, J.P. (1973) Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 3: 1.
28. Braun, T.; Doas, R.F. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72:

CAPITULO	V	PAGINA	246	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

1097.

29. Kornblihtt, A.R.; Flawia, M.M.; Torres, H. N. (1981) Bio - Chem. 20: 1262.
30. Levey, G.S. (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 185: 449.
31. Neer, E.J. (1974) J. Biol. Chem. 249: 6527.
32. Ryan, J.; Storm, D.R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 304.
33. Neer, E.J. (1978) J. Biol. Chem. 253: 1498.
34. Haga, T.; Haga, K.; Gilman, A.G. (1977) J. Biol. Chem. 252: 5776.
35. Stengel, D.; Hanoune, J. (1980) European J. Biochem. 102:21.
36. Kempner, E.S.; Schlegel, W. (1979) Anal. Biochem. 92: 2.
37. Schlegel, W.; Kempner, E.S.; Rodbell, M. (1979) J. Biol. Chem. 254: 5168.
38. Ross, E.M.; Gilman, A. G. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49:533.
39. Nielsen, T.B.; Lad, P.M.; Preston, M.S.; Kempner, E. Schlegel, W.; Rodbell, M. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: - 722.
40. Rodbell, M.; Lad, P.M.; Nielsen, T.B.; Cooper, D.M.F.; Schlegel, W.; Preston, M.S.; Londos, C.; Kempner, E.S. (1981) - Adv. Cyclic. Nucleotide. Res. 14: 3.
41. Rall, T.W.; Sutherland, E.W. (1958) J. Biol. Chem. 232:1065.

CAPITULO	V	PAGINA	247	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

42. Rall, T.W.; Sutherland, E.W. (1962) J. Biol. Chem. 237:1228.
43. Perkins, J.; Moore, M. (1971) J. Biol. Chem. 246: 62.
44. Drummond, G.I.; Duncan, L. (1970) J. Biol. Chem. 245: 976.
45. Neer, E.J. (1973) J. Biol. Chem. 248: 3742.
46. Birnbaumer, L.; Rodbell, M. (1969) J. Biol. Chem. 244:2477.
47. Birnbaumer, L. (1977) "Receptors and Hormone Action" cap.16  
485. Academic Press.
48. Harwood, J.; Rodbell, M. (1973) J. Biol. Chem. 248: 4901.
49. Manganiello, V.C.; Vaughan, M. (1976) J. Biol. Chem. 251: -  
6205.
50. Manganiello, V.C.; Vaughan, M. (1973) J. Biol. Chem. 248: -  
7164.
51. Vaughan, M.; Murad, F. (1969) Biochem. 8: 3092.
52. Flawia, M.M.; Torres, H.N. (1973) FEBS lett. 30: 74.
53. Schimmer, B.P.; Veda, K.; Sato, G.H. (1968) Biochem. Bio -  
phys. Res. Commun. 32: 806.
54. Rodbell, M. Birnbaumer, L.; Pohl, S.L. (1970) J. Biol. Chem.  
245: 718.
55. Vauquelin, G.; Geinet, P.; Hanoune, J.; Strosberg, A.D. -  
(1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 3710.
56. Rodbell, M.; Birnbaumer, L.; Pohl, S.L.; Sundby, F. (1971)

CAPITULO	V	PAGINA	248	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 909.

57. Fain, J.N.; Butcher, F.R. "Cyclic Nucleotides in Mode of -  
Hormone Action" en: Endocrine Physiology Ed. S.M. McCann -  
and A.C. Guyton, pp. 241, (1977) University Park Press.
58. Cuatrecasas, P. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63: 450.
59. Birnbaumer, L.; Pohl, S.L.; Rodbell, M.; Sundby, F. (1972)  
J. Biol. Chem. 247: 2038.
60. Kaumann, A.J.; Birbaumer, L. (1974) J. Biol. Chem. 249:7874
61. Jakobs, K.H.; Aktories, K.; Schultz (1981) Adv. Cyclic Nu -  
cleotide Res. 14: 173.
62. Berridge, M.J. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6: 1.
63. Michell, R.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415: 81.
64. Jakobs, K.H. (1979) Mol. Cell. Endocrinol. 16: 147.
65. Loten, E.G.; Assimacopoulos-Jeannet, F.D.; Exton, J.H.; Park,  
C.R. (1978) J. Biol. Chem. 253: 746.
66. Robinson, G.A.; Butcher, R.W.; Sutherland, E.W. (1967) Ann.  
N.Y. Acad. Sci. 139: 703.
67. Murad, F. Schi Y-M; Rall, T.W.; Sutherland, E.W. (1962) J.  
Biol. Chem. 237: 1233.
68. Jakobs, K.H.; Saur, W.; Schultz, B. (1978) FEBS letters 85:  
167.
69. Aktories, K.; Schultz, G.; Jakobs, K.H. (1979) FEBS lett. 107:

CAPITULO	V	PAGINA	249	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

100.

70. Londos, C.; Cooper, D.M.F.; Schlegel, W.; Rodbell, M. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 5362.
71. Aktories, K.; Jakobs, K.H.; Schultz, G. (1980) FEBS lett. - 115: 11.
72. Londos, C.; Wolff, J. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 5482.
73. Wolff, J.; Londos, C.; Cooper, D.M.F. (1981) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14: 199.
74. Cryer, P.E.; Jarret, L.; Kipnis, D.M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 117: 586.
75. Rodbell, M. (1975) J. Biol. Chem. 250: 5826.
76. Rodbell, M.; Birnbaumer, L.; Pohl, S.L.; Krans, H.M.J. (1971) J. Biol. Chem. 246: 1877.
77. Maguire, M. E.; Ross, E. M.; Gilman, A.G. (1977) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8: 1.
78. Rodbell, M.; Krans, H.M.J.; Pohl, S.; Birbaumer, L. (1971) J. Biol. Chem. 246: 1872.
79. Lin, M.C.; Nicosia, S.; Lad, P.M.; Rodbell, M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 2790.
80. Moore, W.V.; Wolff, J. (1973) J. Biol. Chem. 248: 5705.
81. Lefkowitz, R.J.; Mullikin, D.; Wood, C.L.; Gore, T.B.; Mukherjee, C. (1977) J. Biol. Chem. 252: 5295.

CAPITULO	V	PAGINA	250	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

82. Ross, E.M.; Maguire, M.E.; Sturgill, T.W.; Biltonen, R.L.; Gilman, A.G. (1977) J. Biol. Chem. 252: 5761.
83. Welton, A.F.; Lad, P.M.; Newby, A.C.; Yamamura, H.; Nicosia S.; Rodbell, M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 5947.
84. Spiegel, A.M.; Brown, E.M.; Fedak, S.A.; Woodard, C.J.; Aurbach, G.D. (1976) J. Cyclic Nucleotide Res. 2: 47.
85. Bennett, V.; Cuatrecasas, P. (1976) J. Membr. Biol. 27:207.
86. Cassel, D.; Selinger, Z. (1976) Biochim. Biophys. Acta 452: 538.
87. Cassel, D.; Selinger, Z. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA - 74: 3307.
88. Cassel, D.; Selinger, Z. (1977) J. Cyclic Nucleotide Res. 3: 11.
89. Cassel, D.; Selinger, Z. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA - 75: 4155.
90. Selinger, Z.; Cassel, D. (1981) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14: 15.
91. Gill, D.M. (1977) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8: 85.
92. Sharp, G.W.G.; Hynie, S. (1971) Nature (Lond.) 229: 266.
93. Pierce, N.F.; Greenough, W.B. III; Carpenter, C.C.J.Jr. - (1971) Bacteriol. Rev. 35: 1.
94. Gill, D.M.; King, C.A. (1975) J. Biol. Chem. 250: 6424.

CAPITULO	V	PAGINA	251	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

95. Peterson, J.W.; Lospatullo, J.J.; Finkelstein, R.A. (1972) J. Intelect. Dis. 129: 617.
96. Gill, D.M. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 2064.
97. Martin, B.R.; Houslay, M.D.; Kennedy, E.L. (1977) Biochem. J. 161: 639.
98. Moss, J.; Vaughan, M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 2455.
99. Northup, J.K.; Sternweis, P.C.; Smibel, M.D.; Schleifer, L.S. Ross, E.M.; Gilman, A.G.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77:6516.
100. Birnbaumer, L.; Pohl, S.L.; Krans, H.M.J.; Rodbell, M. (1970) Adv. Biochem. Phychopharmacol. 3: 185.
101. Bilezekian, J.P.; Spiegel, A.M.; Brown, E.M.; Aurbach, G.D. (1977) Mol. Pharmacol. 13: 775.
102. Harden, T.K.; Foster, S.J.; Perkins, J.P. (1979) J. Biol. - Chem. 254: 4416.
103. Schramm, M.; Naim, E. (1970) J. Biol. Chem. 245: 3225.
104. Schramm, M. (1976) J. Cyclic Nucleotide Res. 2: 347.
105. Limbird, L.E.; Lefkowitz, R.J. (1977) J. Biol Chem. 252:799
106. Haga, T.; Haga, K.; Gilman, A.C. (1977) J. Biol. Chem. 252: 5776.
107. Hechter, O. (1965) "Mechanisms of Hormone Action". Ed. by P. Karlson. Academic Press. New York.
108. Rodbell, M. (1971) "Hormones, Receptors and ademyc Cyclase



CAPITULO	V	PAGINA	252	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

and Cyclic 3', 5'-AMP in Biological Systems". Ed. by P. Condliffe and M. Rodbell, pp. 88-95. Fogerty International Center. Government Printing Office.

109. Pfeuffer, T. (1977) J. Biol. Chem. 252: 7224.
110. Cassel, D.; Pfeuffer, T. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA - 75: 3050.
111. Daniel, V.; Litwack, G.; Tomkins, G. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 76.
112. Bourne, H.R.; Coffino, P.; Tomkins, G. (1975) Science 187: 750.
113. Ross, E.M.; Howlett, A.C.; Ferguson, K.M.; Gilman, A.G. - (1978) J. Biol. Chem. 253: 6401.
114. Insel, P.A.; Maguire, M.E.; Gilman, A.G.; Bourne, H.R.; Coffino, P.; Melmon, K.L. (1976) Mol. Pharmacol. 12: 1062.
115. Ross, E.M.; Gilman, A.G. (1977) J. Biol. Chem. 252: 6966.
116. Ross, E.M.; Gilman, A.G. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA - 74: 3715.
117. Brunton, L.L.; Maguire, M.E.; Anderson, H.J.; Gilman, A.G. (1977) J. Biol. Chem. 252: 1293.
118. Haga, T.; Ross, E.M.; Anderson, H.J.; Gilman, A.G. (1977) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 2016.
119. Sternweis, P.C.; Gilman, A.G. (1979) J. Biol. Chem. 254: - 3333.

CAPITULO	V	PAGINA	253	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

120. Johnson, G.L.; Kaslow, H.R.; Farfel, Z.; Bourne, H.R. (1980) Adv. in Cyclic Nucleotide Res. 13: 1.
121. Ahlquist, R.P. (1948) Am. J. Physiol. 153: 586.
122. Lands, A.M.; Arnold, A.; McAuliff, J.P.; Luduena, F.P.; -  
Brown, T.C. (1967) Nature 214: 597.
123. Berthelson, F.; Pettinger, W.A. (1977) Life Sci. 21: 595.
124. Fain, J.N.; garcía Sainz, J. (1980) Life Sci. 26: 1183.
125. Jakobs, K.H. (1979) Mol. Cell. Endocrinol. 16: 147.
126. Venter, J.C.; Fraser, C.M.; Soifer, A.J.; Jeffrey, D.R.; -  
Strauss, W.L.; Charlton, R.R.; Greguski, R. (1981) Adv. Cy-  
clic Nucleotide Res. 14: 135.
127. Howlett, A.C.; Gilman, A.G. (1980) J. Biol. Chem. 255: 2861.
128. Sternweis, P.C.; Northup, J.K.; Hanski, E.; Schleifer, L.S.  
Smigel, M.D.; Gilman, A.G. (1981) Adv. Cyclic Nucleotide -  
Res. 14: 23.
129. Johnson, G.L.; Kaslow, H.R.; Bourne, H.R. (1978) J. Biol. -  
Chem. 253: 7120.
130. Schleifer, L.S.; Garrison, J.C.; Sternweis, P.C.; Northup,  
J.K.; Gilman, A.G. (1980) J. Biol. Chem. 255: 2641.
131. Sternweis, P.C.; Northup, J.K.; Smigel, M.D.; Gilman, A.G.  
(1981) J. Biol. Chem. 256: 11517.
132. Ross, E.M. (1981) J. Biol. Chem. 256: 1949.

CAPITULO	V	PAGINA	254	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

133. Londres, C.; Preston, M.S. (1977) J. Biol. Chem. 252: 5957.
134. Braun, T.; Dods, R.F. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 1097.
135. Steer, M.L.; Levitzki, A. (1975) J. Biol. Chem. 250:2080.
136. Hanski, E.; Sevilla, N.; Levitzki, A. (1977) Eur. J. Biochem. 76: 513.
137. Brostrom, M.A.; Brostrom, O.B.; Breckenridge; Wolff, D.J. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9: (85).
138. Bradham, L.S. (1972) Biochim. Biophys. Acta. 276: 434.
139. Von Hungen, K.; Roberts, S. (1973) Nature, 242: 58.
140. Birnbaumen, L.; Rodbell, M. (1969) J. Biol. Chem. 244:3477.
141. Means, A.R.; Dedman, J.R. (1980) Nature, 285: 73.
142. Meyer, W.L.; Fischer, W.H.; Krebs, E.G. (1964) Biochem. 3: 1033.
143. Cheung, W.Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 533.
144. Kakiuchi, S.; Yamazaki, R. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 1104.
145. Cheung, W.Y. (1980) "Calcium and Cell Function" vol. I:109. Academic Press.
146. Sharma, R.K.; Wanga, T.H.; Wirch, E.; Wang, J.H. (1980) J. Biol. Chem. 255: 5916.

CAPITULO	V	PAGINA	255	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

147. Brostrom, C.O.; Huang, Y-C, Breckenridge, B.M.; Wolff, D.J. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 64.
148. Cheung, W.Y; Bradham, L.S; Lynch, T.J.; Lin, Y.M.; Tallant, E.A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun 66: 1055.
149. Malnoë, A.; Cox, J.A.; Stein, E.A. (1982) Biochim. Biophys. Acta. 714: 84.
150. Ausiello, D.A.; Hall, D. (1981) J. Biol. Chem. 256: 9796.
151. Ofulue, A.F.; Nijjar, M.S. (1981) Biochem. J. 200: 475.
152. Toscano, W.A.; Westcott, K.R.; La Porte, D.C.; Storm, D.R. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 5582.
153. Salter, R.S.; Krinks, M.H.; Klee, C.K.; Neer, E.J. (1981) J. Biol. Chem. 256: 9830.
154. Rodbell, M. (1980) Nature, 284: 17.
155. Bennett, V.; O'Keefe; Cuatrecasas, P. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 33.
156. Cuatrecasas, P.; Hollengberg, M.D. (1976) Advances in Protein Chemistry, vol. 30. New York. pp. 251-451.
157. Singer, S.J.; Nicolson, G.L. (1972) Science, 175: 720.
158. Houslay, M.D.; Ellory, J.C.; Smith, G.A.; Hesketh, T.R.; Stein, J.M.; Warren, G.B.; Metcalfe, J.C. (1977) Biochim. Biophys. Acta. 467: 208.
159. Schulster, D.; Orly, J.; Seidel, G.; Schramm, M. (1978) J. Biol. Chem. 253: 1201.

CAPITULO	V	PAGINA	256	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

160. Selinger, Z.; Cassel, D. (1981) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14: 15.
161. Tolkovsky, A.M.; Levitzki, A. (1978) Biochem. 17: 3795.
162. Levinson, S.L.; Blume, A. (1977) J. Biol. Chem. 252: 3766.
163. Pfeuffer, T. (1979) FEBS lett. 101: 85
164. Limbird, L.E.; Hickey, A.R.; Lefkowitz, R.J. (1979) J. Cyclic Nucleotide Res. 5: 251.
165. Cassel, D.; Levkowitz, H.; Selinger, Z. (1977) J. Cyclic Nucleotide Res. 3: 393.
166. Bitensky, M.W.; Gorman, R.E. (1973) Progr. Biophys. Mol. Priol. 26: 409.
167. Hers, H.G. (1976) Ann. Rev. Biochem. : 167.
168. Walsh, D.A.; Perkins, J.P.; Krebs, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3763.
169. Kuo, J.F.; Greengard, P. (1970) J. Biol. Chem. 245: 2493.
170. Waisman, D.M.; Singh, T.J.; Wang, J.H. (1978) J. Biol. Chem. 253: 3387.
171. Sen, G.C.; Taira, H.; Lengyel, P. (1978) J. Biol. Chem. 253: 3387.
172. Beavo, J.A.; Betchel, P.J.; Krebs, E.G. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 241.
173. Rosen, O.M.; Erlichman, J.; Rubin, C.S. (1975) Adv. Cyclic.

CAPITULO	V	PAGINA	257	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

Nucleotide Res. 5: 253.

174. Corbin, J.D.; Keely, S.L. (1977) J. Biol. Chem. 252: 910.
175. Hofman, F.; Beavo, J.A.; Betchel, P.J.; Krebs, E.G. (1975) J. Biol. Chem. 250: 7795.
176. Rangel-Aldao, R.; Rosen, O.M. (1976) J. Biol. Chem. 251: - 3376.
177. Hoppe, J.; Marutzky, R.; Shaltiel, S. (1975) Eur. J. Biochem. 90: 427.
178. Walsh, D.A.; Ashby, C.D. (1973) Recent. Prog. Horm. Res. 29: 329.
179. Beavo, J.A.; Betchel, P.J.; Krebs, E.G. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 3580.
180. Costa, M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 1311.
181. Fallon, E.F.; Agarawal, R.; Furth, E.; Steiner, A.L.; Couden, R. (1974) Science 184: 1089.
182. Brunton, L.L.; Hayes, J.S.; Mayer, S.E. (1981) Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 14: 391.
183. Li, H.C.; Hsiao, K.J.; Chan, W.W.S. (1978) Eur. J. Biochem. 84: 215.
184. Krebs, E.G.; Beavo, J.A. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48: 923.
185. Huang, F.L.; Glinesman, W.H. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 3004.

CAPITULO	V	PAGINA	258	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

186. Nimmo, G.A.; Cohen, P. (1978) Eur. J. Biochem. 87: 353.
187. Friedman, D.L.; Larner, J. (1963) Biochem. 2: 669.
188. Cohen, P. (1982) Nature, 296: 613.
189. Steinberg, D. (1976) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 7: 157.
190. Datta, A.; de Haro, C.; Sierra, J.M.; Ochoa, S. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 1463.
191. Greengard, P. (1976) Nature, 260: 101.
192. England, P.J. (1980) "Molecular Aspects of Cellular Regulation", vol. 1: 153. Elsevier, Amsterdam.
193. Gottesman, M.M. (1981) Cold Spring Harb. Conf. Cell. Proliferation, 8: 195.
194. Nimmo, H.G.; Cohen, P. (1977) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8: 145.
195. Berridge, M.J. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6: 1.
196. Monod, J. (1947) Growth, 11: 223.
197. Makman, R.S.; Sutherland, E.Q. (1965) J. Biol. Chem 240:1039.
198. Perlman, R.L.; Pastan, I. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 656.
199. Pastan, I.; Perlman, R.L. (1970) Science, 169: 339.
200. de Crombrughe, B.; Varmus, H.E.; Perlman, R.L.; Pastan, I. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 894.

CAPITULO	V	PAGINA	259	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

201. Pastan, I.; Adhya, S. (1976) Bacteriol. Rev. 40.
202. Zubay, G.; Schwartz, D.; Beckwith, J. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66: 104.
203. Emmer, M.; Crombrugghe, B.; Pastan, I.; Perlman, R.L. (1970) Prod. Nat. Acad. Sci. USA 66: 480.
204. Dickson, R.C.; Abelson, J.; Barnes, W.M.; Reznikoff, W.S. - (1975) Science, 187: 27.
205. Ide, M. (1969) Biochem. Biophys. Rev. Commun. 36: 42.
206. Tao, M.; Lipmann, F. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63:86.
207. Peterkofsky, A. (1981) Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 14:215.
208. Peterkofsky, A.; Gazdar, C. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 1099.
209. Ide, M.; Yoshimoto, A.; Okabayashi, T. (1967) J. Bacteriol. 94: 317.
210. Takai, K.; Kurashina, Y.; Suzuki-Hori, C.; Okamoto, H.; Hayashi, O. (1974) J. Biol. Chem. 249: 1965.
211. Ide, M. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 144: 262.
212. Konijn, T.N.; Van de Meene, J.G.C.; Bonner, J.T.; Barkley, D. S. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58: 1152.
213. Bonner, J.T.; Barkley, D.S.; Hall, E.M.; Konijn, T.M.; Mason J.W.; O'Keefe, G.; Wolfe, P.B. (1969) Dev. Biol. 20: 72.
214. Gerisch, G.; Malchow, D. (1966) Adv. Cyclic Nucleotide Res.



CAPITULO V	PAGINA 260	BIBLIOGRAFIA
------------	------------	--------------

7: 49.

215. Robertson, A.; Drage, D.J.; Cohen, M.H. (1972) Science 175: 333.
216. Riedel, V.; Malchow, D.; Gerisch, G.; Nägel, F. (1972) - Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 279.
217. Farnham, C.J.M. (1975) Expt. Cell. Res. 91: 36.
218. Rossomando, E.F.; Sussman, M. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 604.
219. Rossomando, E.F.; Sussman, M. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA.
220. Klein, C.; Brachet, P.; Darmon, M. (1977) FEBS lett. 76:116.
221. Rosen, S.D.; Kafka, J.A.; Simpson, D.L.; Barondes, S.H. - (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 2554.
222. Landfear, S.M.; Lodish, H.F. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. - USA 77: 1044
223. Lovett, J.S. (1975) Bacteriol. Rev. 39: 345.
224. Gomes, S.L.; Mennucci, L.; Maia, J.C.C. (1978) Biochim. Biophys. Acta. 541: 190.
225. Vale, V.L.; Gomes, S.L.; Maia, J.C.C.; Mennucci, L. (1976) - FEBS lett. 67: 189.
226. Gomes, S.L.; Mennucci, L.; Maia, J.C.C. (1980) Cell. Differ. 9: 169.

CAPITULO	V	PAGINA	261	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

227. Gomes, S.L.; Maia, J.C.C. (1979) Biochim. Acta. 567: 257.
228. Cohen, R.J. (1974) Nature, 251: 144.
229. Cohen, R.J.; Nees, J.L.; Whiddon, S.M. (1980) Phytochem.19: 1913.
230. Sypherd, P.S.; Borgia, P.T.; Paznokas, J.L. (1978) Adv. Microbiol. Physio. 18: 68.
231. Larsen, A.D.; Sypherd, P.S. (1974) J. Bacteriol. 117: 432.
232. Daveto, C.; Epstein, A.; Passeron, S. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169: 449.
233. Paznokas, J.L.; Sypherd, P.S. (1975) J. Bacteriol. 124:134.
234. Cantore, M.L.; Galvagno, M.A.; Passeron, S. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 199: 312.
235. Uno, I.; Ishikawa, T. (1973) J. Bacteriol. 113: 1240.
236. Uno, I.; Yamaguchi, M.; Ishikawa, T. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 479.
237. Uno, I.; Ishikawa, T. (1973) J. Bacteriol. 113: 1249.
238. Van Wijk, R.; Konijn, T.M. (1971) FEBS lett. 13: 184.
239. Mahler, H.R.; Lin, C.C. (1978) Biochem. Biophys. Commun.83: 1039.
240. Sy, J.; Richter, D. (1972) Biochem. 11: 2788.
241. Mahler, H.R.; Jaynes, P.K.; McDonough, J.P.; Hanson, D.K. -

CAPITULO	V	PAGINA	262	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

- (1981) Current Topocs in cellular Regulation, 18: 455.
242. Voichick, J.; Elson, C.; Granner, D.; Shrago, E. (1973) J. - Bacteriol 115: 58.
243. Roberts, C.T.; Morse, D.E. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 1810.
244. Kassia, S.; Kindler, S.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 391: 513.
245. Brenner, Z. (1973) Ann. Rev. Microbiol. 27: 347.
246. Franco Da Silveira, J.; Zingales, B.; Colli, W. (1977) Biochim. Biophys. Acta. 481: 722.
247. Strickler, J.E.; Patton, C.L. (1975) Science, 190: 1110.
248. Seale, T. (1973) J. Bacteriol. 113: 1015.
249. Takahara, H.; Matsuda, K. (1977) J. Biochem. 81: 1587.
250. Fontana, J.D.; Krisman, C.R. (1978) Biochim. Biophys. Acta 540: 183.
251. Téllez de Iñón, M.T.; Terenzi, H.F.; Torres, H.N. (1969) - Biochim. Biophys. Acta. 191: 768.
252. Téllez de Iñón, M. T.; Torres, H.N. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66: 459.
253. Téllez de Iñón, M.T.; Torres, H.N. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 297: 399.
254. Flawiá, M.M.; Torres, H.N. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6880.

CAPITULO	V	PAGINA	263	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

255. Flawia, M.M.; Torres, H.N. (1972) Biochim. Biophys. Acta. -  
289: 428.
256. Flawia, M.M.; Torres, H.N. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA  
69: 2870.
257. Flawia, M.M.; Torres, H.N. (1973) J. Biol. Chem. 248: 4517.
258. Flawia, M.M.; Torres, H.N. (1973) FEBS lett. 30: 74.
259. Scott, W.A.; Solomon, B. (1973) Biochem. Biophys. Res. Com-  
mun. 53: 1024.
260. Téllez de Iñón, M.T.; Glikin, G.C.; Torres, H.N. (1982) Bio-  
chem. J. 203 ( en prensa).
261. Glod, M.H.; Sebel, I.H. (1974) J. Biol. Chem. 249: 2417.
262. Judewicz, N.D.; Glikin, G.C.; Torres, H.N. (1980) Arch. Bio  
chem. Biophys. 204: .
263. Glikin, G.C.; Judewicz, N.D.; Torres, H.N. (1982) Mol. Cell.  
Biochem. (en prensa).
264. Torres, H.N.; Flawia, M.M.; Terenzi, H.F.; Téllez de Iñón,  
M.T. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 67.
265. Terenzi, H.F.; Flawia, M.M.; Torres, H.N. (1974) Biochem. -  
Biophys. Res. Commun. 58: 990.
266. Terenzi, H.F.; Flawia, M.M.; Téllez de Iñón, M.T.; Torres,  
H.M. (1976) J. Bacteriol 126: 91.
267. Pall, M.L. (1977) J. Biol. Chem. 252: 7146.

CAPITULO	V	PAGINA	264	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

268. Trevillyan, J.M.; Pall, M.L. (1979) J. Bacteriol. 138: 397.
269. Scott, W.A.; Solomon, D. (1975) J. Bacteriol. 122: 454.
270. Judewicz, N.D.; Torres, H.N. (1979) FEBS lett. 107: 160.
271. Pall, M.L. (1981) Microbiol. Rev. 45: 462.
272. Vogel, H.J. (1956) Microbiol. Genet. Bull. 13: 4243.
273. Rodbell, M. (1967) J. Biol. Chem. 242: 5744.
274. Salomon, Y.; Londos, C.; Rodbell, M. (1974) Anal. Biochem.-  
58: 541.
275. Bray, C. (1960) Anal. Biochem. 1: 279.
276. Cuatrecasas, P. (1970) J. Biol. Chem. 245: 3059.
277. Worthington Enzyme Manual.(1972) Worthington Biochemical Cor-  
poration, pp. 7-12. Free-hold.
278. Terenzi, H.F.; Roselino, E.; Dasseron, S. (1971) Eur. J. -  
Biochem. 18: 342.
279. Clarke, S. (1975) J. Biol. Chem. 250: 5459.
280. Meunier, J.C.; Olsen, R.W.; Changeux, J.P. (1972) FEBS lett.  
24: 63.
281. Edelstein, S.J.; Schachman, H.K. (1967) J. Biol. Chem. 242:  
306.
282. Martin, R.G.; Ames, B.N. (1961) J. Biol. Chem. 236: 1372.

CAPITULO	V	PAGINA	265	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

283. Siegel, L.M.; Monty, K.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta. - 112: 346.
284. Laemmli, U.K. (1970) Nature, 227: 680.
285. Oakley, B.R.; Kirsch, D.R.; Morris, N.K. (1980) Anal. Biochim. 105: 361.
286. Amons, R.; Schrier, P.I. (1981) Anal. Biochem. 116: 439.
287. Hager, D.A.; Burgess, R.R. (1980) Anal. Biochem. 109: 76.
288. Thompson, W.J.; Appleman, M.M. (1971) Biochem. 10: 311.
289. Jamieson, G.A.Jr.; Vanaman, T.C. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 1048.
290. Kennett, R.H.; McKearn, T.J.; Bechtol, K.B.; (eds) (1980) - Monoclonal Antibodies, 365, Plenum Press, New York.
291. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. - (1951) J. Biol. Chem. 193: 285.
292. Randerath, K.; Randerath, E. (1967) Methods. Enzymol. 12 A: 323.
293. Paladani, A.C.; Leloir, L.F. (1952) Biochem. J. 51: 426.
294. Wahrmann, J.P.; Gros, F.; Plan, J.P.; Schapira, G. (1980) - Biochim. Biophys. Acta. 612: 421.
295. Stellwagen, E.; Baker, B. (1976) Nature, 261: 719.
296. Homcy, C.; Wrenn, S.; Haber, E. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 59.

CAPITULO	V	PAGINA	266	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

297. Swizlocki, N.J.; Magnuson, T.; Tierney, J. (1977) Arch.Bio-chem. Biophys. 179: 157.
298. Northup, J.K.; Renart, M.F.; Grove, J.R.; Mausour, T.E. - (1979) J. Biol. Chem. 254: 11861.
299. Neer, E.J.(1978) J. Biol. Chem. 253: 5808.
300. Birnbaumer, L.; Pohl, S.L.; Rodbell, M. (1969) J. Biol.Chem. 244: 3468.
301. Tauton, O.D.; Roth, J.; Pactan, I. (1969) J. Biol. Chem. 244: 247.
302. Garbers, D.L.; Kopf, G.S. (1980) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 13: 251.
303. Cheng, C.Y.; Boettcher, B. (1979) Biochem. Biophys. Res.Com mun. 91: 1.
304. Stengel, D.; Hanoune, J. (1981)J. Biol. Chem. 256: 5394.
305. Hebdon, G.M.; Le Vine III, H.; Sahyoun, N.E.; Schmitges, C.J. Cuatrecasas, P. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78: 120.
306. Ross, E.M.; Haga, T.; Howlett, A.C.; Schwarzmeier, J.; Schleifer, L.S.; Gilman, A.G. (1978) Adv. in Cyclic Nucleotide Res. 9: 53.
307. Bilezikian, J.P.; Aurbach, G.D. (1973) J. Biol. Chem. 248: - 5575.
308. Pohl, S.L.; Birnbaumer, L.; Rodbell, M. (1971) J. Biol.Chem. 246: 1849.

CAPITULO	V	PAGINA	267	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

309. Lad, P.M.; Nielsen, T.B.; Preston, M.S.; Rodbell, M (1980) J. Biol. Chem. 255: 988.
310. Chen, T.C.; Puschett, J.B. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 100: 1471.
311. Rozensweig, Z.; Kindler, S.H. (1972) FEBS lett. 25: 221.
312. Gomes, S.L.; Mennucci, L.; Maia, J.C.C. (1979) FEBS lett. 99
313. Hubbard, M.; Bradley, M.; Sullivan, P.; Shepard, M.; Forrester, I. (1982) FEBS lett. 137: 85.
314. Jamieson, G.S.; Vanaman, J.C. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 1048.
315. Gopalakrishna, R.; Anderson, W.B. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 104: 830.
316. Means, A.R.; Tash, J.S.; Chafouleas, J.G. (1982) Physiol. - Rev. 62: 1.
317. Bazari, W.; Clarke, M. (1981) J. Biol. Chem. 256: 3598.
318. Yazawa, M.; Yagt, K.; Toda, H.; Kondo, K.; Narita, K.; Yamazaki, R.; Sobue, K.; Kakiuchi, S.; Nagao, S.; Nozawa, Y. - (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 99: 1051.
319. Kuznicki, J.; Kuznicki, L.; Drabikowski, W. (1979) Cell. - Biol. Int. Rep. 3: 17.
320. Gitelman, S.E.; Witman, G.B. (1980) J. Biol. Chem. 98: 764.
321. Clarke, M.; Bazari, W.L.; Kayman, S.G. (1980) J. of Bacteriol. 141: 397.



CAPITULO	V	PAGINA	268	BIBLIOGRAFIA
----------	---	--------	-----	--------------

322. Wolff, J.; Cook, G.H.; Gold Hammer, A.R.; Perkowitz, S.A.:  
(1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 3841.
323. Hybridoma Techniques (1980) Cold Spring Harbor, New York.
324. Köhler, G.; Milstein, C. (1975) Nature, 256: 495.
325. Brandwein, H.; Lewicki, J.; Murad, F. (1981) Proc. Nat Acad. Sci. USA 78: 4241.
326. Scott, Hansen, R.; Beavo, J.A. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 2788.

	PAGINA 269	ABREVIATURAS
--	------------	--------------

#### ABREVIATURAS

1. ADP adenosina 5'- difosfato
2. 5'-AMP adenosina 5'-monofsfato
3. ATP adenosina 5'-trifosfato
4. cAMP adenosina 3'-5' monofosfato ciclico
5. cGMP guanosina 3'-5' monofosfato ciclico
6. EDTA Acido etilendiaminotetracético
7. EGTA Acido etilenglicol-bis-( aminoetiléter)-N,N' tetracético
8. GTP guanosina 5'-trifosfato
9. GppNHp guanil-5'-yl imidodifosfato
10. HEPES N-2-hidroxietyl-piperazina-N'-2-ácido etanosulfónico
11. IgG Inmunoglobulina
12. NAD Nicotinamida adenina dinucleótido
13. PEP fosfoenol pirúvico
14. PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
15. Pi ácido ortofosfórico
16. RNA ácido ribonucleico
17. DNA ácido desoxirribonucleico
18. SDS Duodecil sulfato sódico
19. Tris 2-amino-2(hidroximetil)-1.3 propanodiol
20. PPi Pirofosfato

	PAGINA 270	AGRADECIMIENTOS
--	------------	-----------------

# AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a cuantas personas y entidades han contribuido al logro del presente trabajo, y de un modo especial a

El Dr. Jaime Monreal, Investigador Científico, Jefe de la Unidad de Neurobioquímica del Instituto Cajal del C.S.I.C. y director de esta Tesis, por todos sus consejos, enseñanzas y apoyo continuo.

El Dr. Luis F. Leloir y a los miembros del Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campo - mar" de Buenos Aires, por haberme permitido la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en el citado Instituto.

El Dr. Hector Torres y a la Dra. Mirtha Flawiá, por haber guiado y estimulado mi trabajo y por todo su apoyo durante mi estancia en Buenos Aires.

El Profesor Angel Martín Municio, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense, por haber aceptado ser ponente de esta Tesis.

A mis compañeros y amigos, Alberto Kornblihtt, M<sup>a</sup> Teresa Tellez de Iñón, Gerardo Glikin, y Raúl Andino, por toda su ayuda y colaboración contribuyendo a la realización de este trabajo. Igualmente a Luis Molina, Mónica Torruella, Ricardo Attar, y Eduardo Caferatta, por su inapreciable ayuda, especialmente durante la obtención de los anticuerpos monoclonales.

A mis amigos J.S. Orlando Aguilar y Manuel Criado, por su estímulo y sus buenos consejos.

Al C.S.I.C. de España y al C.O.N.I.C.E.T. de la Argentina por la ayuda económica prestada mediante una beca de intercambio.



ADENILATO CICLASAS DEBILMENTE ASOCIADAS A MEMBRANA